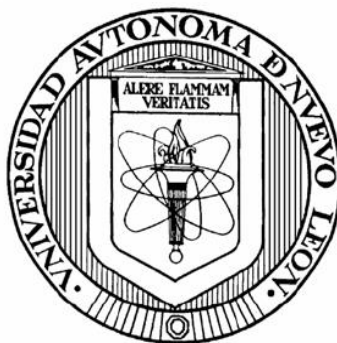


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA AL TRATAMIENTO
CON DICLOROACETATO DE SODIO O PLATA COLOIDAL

Por

MARIEL IRAIDA CHAPA RICO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

Enero, 2015

**EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA AL
TRATAMIENTO CON DICLOROACETATO DE SODIO
O PLATA COLOIDAL**

Comité de Tesis

Director de Tesis
Dr. Moisés Armides Franco Molina

Secretario
Dr. Edgar Mendoza Gamboa

Vocal
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal
Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Asesor Externo
M.C. Crystel Aleyvick Sierra Rivera

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Moisés Armides Franco Molina.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por la vida y el tiempo que me prestó para poder cumplir esta meta más en mi vida, por estar siempre presente en cada momento y detalle, por cada bendición que me ha mostrado a lo largo de este camino.

A mi esposo Carlos

Porque sabemos que tenemos diferente forma de pensar y a pesar de eso siempre me ha apoyado en cada paso, por su amor y paciencia, por la familia que formamos juntos, los amo.

A mi Carlitos

Porque sin decidirlo me acompañó desde que se estaba formando dentro de mí desde el inicio de este proyecto, por sus sonrisa, detalles y amor incondicional.

A mis padres

Por la vida que me dieron, porque siempre me alentaron a seguir adelante a pesar de cualquier circunstancia, por cuidar siempre de Carlitos, porque gracias a ellos soy lo que soy y he podido cumplir mis metas.

A mis hermanos

Por ser parte muy importante de mi vida y por cuidar de mi hijo en este tiempo.

A mis suegros

Por su apoyo en el tiempo de estudio y haber cuidado a Carlitos a lo largo de mi maestría.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB-UANL

Por el apoyo económico brindado para la realización de este importante proyecto.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Jefa del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, mi agradecimiento por el apoyo brindado para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Moisés Franco Molina

Por estar bajo la dirección de todo este trabajo, por haber sido mi asesor, por haberme aceptado como alumna, por haberme tenido paciencia durante todo este tiempo y comprensión en los momentos difíciles, gracias por todo el apoyo.

A mi comité de Tesis

Al Dr. Edgar Mendoza, por su apoyo y asesoría cuando lo necesité en cuestiones experimentales y su ayuda para mejorar este trabajo. Al Dr. Pablo Zapata por su comprensión y apoyo en este proyecto y en clases, por haber sido un excelente maestro para mí y mis compañeros. A la Dra. Itza, por sus contribuciones y colaboraciones en mi trabajo.

A Conacyt

Por el apoyo económico brindado para la culminación de este proyecto.

A la Maestra Herlinda Vielma

Por su inmensa e incondicional ayuda, en cuestiones de citometría de flujo, toma de muestras, apoyo de material, porque siempre hacia un tiempo en su agenda para atenderme con la mejor disposición.

A mis amigas

Crystel, Erika, Faby, Carmen y Yareellys, porque sin ellas no hubiese podido terminar este proyecto, por su ayuda incondicional, sus consejos, por todos los momentos, de risas, llanto, estrés, por siempre estar ahí.

A todos mis amigos y compañeros de clase

*Edgar, Karen, Oscar, Alex, Luis Felipe, Ashanti, Alberto, Edgar Fernández, César, Ada, Marcela y Edith, por haber sido mis compañeros de laboratorio y de clases, por su ayuda que me brindaron cuando necesitaba algo o tenía dudas en alguna materia o protocolo, mil gracias. Erik Carrizales, Edgar López y Erika por su contribución especial y estar siempre disponibles como voluntarios para las tomas de muestras de sangre mil gracias a ellos y a los demás voluntarios. Paco, por su ayuda en los experimentos con *D. melanogaster* muchas gracias.*

Al personal del LIV

Por su ayuda para la realización de este trabajo, apoyo con material, trámites, toma de muestras y demás.

A mis amigas

Yanis, Mayle y Lili, porque siempre me alentaron a seguir adelante y a no rendirme, por recordarme que yo podía lograrlo, gracias por tantos años de amistad.

A mis amigas

Mónica, Damaris, Rocío, Diana, Ale, Sandra, Martha y Perla, por su amistad incondicional a pesar de que no siempre coincidimos en tiempos, por ser mis colegas, por su ayuda y consejos, por ser mujeres valientes y trabajadoras.

DEDICATORIA

A mi esposo, te amo con todo mi corazón, gracias por cursar estos dos años y medio conmigo, por haber vivido tantas experiencias en este tiempo, el embarazo de nuestro hijo al mismo tiempo que esta maestría, por tu apoyo siempre en todo, gracias por estar siempre conmigo.

A mi hijo, por su paciencia todo este tiempo, porque sin entender el porqué de las cosas, siempre me buscaba y tenía un abrazo y una sonrisa para mí, te amo.

A mi mamá, por alentarme siempre a seguir y no rendirme, por ser mi gran ejemplo y por su amor incondicional, por cuidarme siempre a mi Carlitos.

A mi papá, porque siempre ha creído en mí, y me ha apoyado en todo, por ser el ejemplo intachable de trabajo y responsabilidad, gracias.

A mi hermana Yisvi, porque a pesar de estar en su último año de la carrera y estar con la escritura de su tesis, siempre me cuidó a mi Carlitos como si fuera su hijo, gracias por estar en todo conmigo hermana.

A mi tía Perla Rico, por darme ánimos siempre para seguir adelante y no rendirme, por ser siempre un ejemplo en mi vida y seguir juntas a pesar de la distancia.

A Crys, por ser mi asesora número uno, por tenerme mil paciencia al no conocer de esta área, por ayudarme en cada experimento, cálculo, y protocolo, por su amistad siempre, por sus consejos y apoyo, por vivir conmigo esta experiencia, por compartir conmigo su trabajo de maestría, por cada anécdota de felicidad, tristeza y comprensión, gracias por absolutamente todo.

APOYO FINANCIERO

Un especial agradecimiento al Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB-UANL y a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla Jefa del Departamento de Inmunología y Virología por el importante apoyo económico brindado para la realización de este proyecto, el uso de instalaciones, material y equipo indispensables para esta investigación.

“Hay dos formas de ver la vida: una es creer que no existen milagros, la otra es creer que todo es un milagro”.

Albert Einstein

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Sistema Inmunológico.....	3
2.2 Células del Sistema Inmunológico.....	3
2.3 Citocinas.....	6
2.4 Dicloroacetato de Sodio.....	12
2.5 Plata Coloidal.....	14
2.6 Óxido Nítrico en El Sistema Inmune.....	16
2.7 <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	21
5.1 Objetivo General.....	21
5.2 Objetivos Particulares.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP).....	22
6.2 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na).....	22
6.3 Plata coloidal (Ag C).....	23

6.4 Evaluación de la viabilidad en CMSP tratadas con DCA-Na o AgC mediante la técnica de MTT.....	23
6.5 Evaluación la producción de las citocinas TH1, TH2 y TH17 en CMSP.....	24
6.6 Determinación de poblaciones celulares CD3 ⁺ , CD3 ⁻ CD19 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ y CD16 ⁺ CD56 ⁺	28
6.7 Preparación de cultivos de macrófagos murinos.....	29
6.8 Evaluación de la viabilidad celular en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o AgC	29
6.9 Ensayo de fagocitosis mediante FITC-Dextran.....	30
6.10 Ensayo de óxido nítrico en macrófagos murinos.....	31
6.11 Medición de nitrato y nitrito.....	32
6.12 Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
6.13 Análisis estadísticos.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Evaluación de la viabilidad en CMSP tratadas con DCA-Na o AgC....	35
7.2 Evaluación de la producción de las citocinas TH1, TH2 y TH17 en en CMSP tratadas con DCA-Na o AgC	36
7.3 Determinación de las poblaciones celulares CD3 ⁺ , CD3 ⁻ CD19 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ , y CD16 ⁺ CD56 ⁺ en en CMSP tratadas con DCA-Na o AgC	37
7.4 Determinación de la actividad fagocítica en macrófagos tratados con DCA-Na o AgC	44
7.5 Análisis de mutagenicidad de los tratamientos dicloroacetato de sodio y plata coloidal.....	48
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES.....	59
10. PERSPECTIVAS.....	60
11. LITERATURA CITADA.....	61
12. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Concentraciones estándar de nitrato.....	33
Tabla 2. Producción de citocinas.....	36
Tabla 3. Índice de sobrevivencia en larvas tratadas con DCA-Na o Ag C.....	52
Tabla 4. Índice de sobrevivencia en las moscas tratadas con DCA-Na o Ag C.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Ensayo de viabilidad celular en CMSP por la técnica de MTT.....	35
Figura 2. Efecto de los tratamientos de DCA-Na o Ag C sobre la población T CD3 ⁺	37
Figura 3. Efecto de los tratamientos de DCA-Na o Ag C sobre la población T CD3 ⁺ CD19 ⁺	38
Figura 4. Efecto de los tratamientos de DCA-Na o Ag C sobre las células T CD3 ⁺ CD4 ⁺	39
Figura 5. Efecto de los tratamientos de DCA-Na o Ag C sobre las células T CD3 ⁺ CD8 ⁺	40
Figura 6. Efecto de los tratamientos de DCA-Na o Ag C sobre las células T CD16 ⁺ CD56 ⁺	41
Figura 7. Determinación de poblaciones celulares CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ y CD3 ⁺ CD8 ⁺	42
Figura 8. Determinación de poblaciones celulares CD19 ⁺ y CD16 ⁺ CD56 ⁺	43
Figura 9. Ensayo de viabilidad celular en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C con la técnica de yoduro de propidio.....	45
Figura 10. Ensayo de fagocitosis mediante FITC-Dextran en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C	46
Figura 11. Ensayo de óxido nítrico en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C	47

Figura 12. Viabilidad de moscas eclosionadas sometidas a diferentes tratamientos.....	49
Figura 13. Viabilidad de larvas de <i>D. melanogaster</i> sometidas a diferentes tratamientos.....	49
Figura 14. Evaluación de la morfología de <i>D. melanogaster</i> wild type.....	50
Figura 15. Evaluación de la morfología de <i>D. melanogaster</i> ebony.....	50
Figura 16. Evaluación de la morfología de <i>D. melanogaster</i> curly.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

293	Línea de células epiteliales de riñón
α	Símbolo de alfa
A 549	Línea de células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón en humano
AcetilCoA	Acetil coenzima a
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Símbolo químico del elemento plata
Ag C	Plata coloidal
AN3CA	Línea celular de cáncer de endometrio
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
β	Símbolo de beta
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana
cNOS	Óxido nítrico sintasa dependiente de calcio
CO ₂	Dióxido de carbono
CXCR1	Receptor de quimiocinas tipo 1
CXCR4	Receptor de quimiocinas tipo 4
CXCR8	Receptor de quimiocinas tipo 8
CXCR10	Receptor de quimiocinas tipo 10
DCA-Na	Dicloroacetato de sodio
DL ₅₀	Dosis letal media
DL ₁₀₀	Dosis letal 100%
Fas	Proteína citoplasmática con dominio de muerte
Fas L	Ligando de la proteína Fas
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HEC1A	Línea celular de cáncer de endometrio A
HEC1B	Línea celular de cáncer de endometrio B
IgE	Inmunoglobulina E

INF- γ	Interferon gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa independiente de calcio
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-2R α	Receptor de IL-2 α
IL-2R β	Receptor de IL-2 β
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17 A	Interleucina 17 tipo A
IL-17 B	Interleucina 17 tipo B
IL-17 C	Interleucina 17 tipo C
IL-17 D	Interleucina 17 tipo D
IL-17 E	Interleucina 17 tipo E
IL-17 F	Interleucina 17 tipo F
kDa	Kilodaltones
LAK	Linfocitos asesinos activados
LDH	Lactato deshidrogenasa
LT	Linfotoxina
μm	Micrómetros
μg	Microgramos
μL	Microlitros
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NADPH	Fosfato Dinucleotido adenina nicotinamida
NK	Natural killer

NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂ ⁻	Anión superóxido
O ₂	Oxígeno
OH ⁻	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PDKs	Piruvato deshidrogenasa quinasa
RL95-2	Línea celular de carcinoma endometrial
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTNF	Receptores del factor de necrosis tumoral
SFB	Suero fetal bovino
SKUT1B	Linea celular de cáncer de endometrio
SOD	Superóxido dismutasa
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCR	Viabilidad celular relativa
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

RESUMEN

El sistema inmune es el encargado de desencadenar respuestas ante la presencia de agentes externos con el objetivo de mantener un equilibrio en la salud del individuo, se encuentra amenazado en patologías como el cáncer en donde los pacientes suelen presentar una inmunosupresión dada por los agentes quimioterapéuticos administrados como tratamiento. Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio han demostrado el efecto antitumoral del dicloroacetato de sodio y la plata coloidal sin embargo, muy poco se conoce acerca de su repercusión en el sistema inmune. Evaluamos el efecto de ambos compuestos sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica humana *in vitro* extraída de donadores sanos, mediante la técnica de MTT, por otra parte la producción de citocinas y la determinación de poblaciones linfoides se realizaron por la técnica de citometría de flujo. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad y capacidad de fagocitosis en macrófagos peritoneales murinos por citometría de flujo, y la concentración de NO_3^- mediante el kit Nitrate Nitrite Assay. Se encontró que a las 72 horas se mantiene una viabilidad celular relativa en PBMC de 80% y 81% en DCA-Na (300mM/mL) y Ag C (10.5 ng/mL), respectivamente. Además se determinó un aumento de las poblaciones linfocíticas $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ y $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ causado por el tratamiento DCA-Na y de las poblaciones $\text{CD3}^-\text{CD19}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ y $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ en el caso de Ag C. También se demostró que ambos tratamientos son capaces de aumentar la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos *in vitro* en un 23.5% en el caso del DCA-Na y 20.17% con el tratamiento Ag C. Por otra parte, fueron realizadas pruebas de mutagenicidad aplicando estos tratamientos en un cultivo de larvas de *Drosophila melanogaster*, no encontrando alteraciones morfológicas ni diferencia significativa en el índice de sobrevivencia ($p < 0.05$). Nuestros resultados sugieren que el uso del dicloroacetato de sodio o la plata coloidal no afecta negativamente a las células del sistema inmunológico y su posible uso como tratamiento adyuvante en el tratamiento del cáncer.

ABSTRACT

The immune system responsible for triggering responses in the presence of external agents in order to maintain a balance in the individual's health, it could be threatened in pathologies such as cancer where patients often exhibit immunosuppression given by the chemotherapeutic agents administered as treatment. Previously we have studied the antitumor effect of sodium dichloroacetate and colloidal silver, however, there is scarce information about their impact on the immune system. We have evaluated the effect of both compounds on the viability of PBMC *in vitro* by the reduction of MTT, also we have examined the cytokine production and the lymphoid subsets by flow cytometry. Additionally the viability and FITC-Dextran uptake by murine peritoneal macrophages were also evaluated by flow cytometry, and the concentration of NO_3^- through the Nitrate Nitrite Assay kit. We have found that after 72 hours the cell viability on PBMC was 80% in the case of DCA Na (300 mM / mL) and 81 % in the cells treated with Ag C (10.5 ng / mL). We also determined an increasing on the lymphocyte subsets $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ and $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ caused by DCA Na, and in the case of the treatment Ag C the increase was found on the subsets $\text{CD3}^+\text{CD19}^+$, $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ and $\text{CD16}^+\text{CD56}^+$. It was shown that both treatments are capable of enhancing the FITC-Dextran uptake in murine peritoneal macrophages *in vitro* from 4.87% to 23.5% in the case of DCA Na, and 20.17 % with the treatment Ag C.

Besides mutagenicity tests were performed by applying these treatments in cultured *Drosophila melanogaster* larvae, no morphological alterations were founded or significant difference in the survival rate ($p < 0.05$). Our results suggest that the use of sodium dichloroacetate or colloidal silver does not adversely affect the cells of the immune system and their potential use as an adjuvant in cancer therapy.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es la principal defensa que tiene nuestro organismo contra agentes externos, bacterias, virus y cualquier otra amenaza a la que se encuentre expuesto. Para lograrlo posee diversos tipos celulares que interactúan entre ellos a través de mediadores como son las citocinas, las cuáles despiertan diferentes respuestas según el tipo de agente que esté dañando al cuerpo humano.

Por otra parte, el cáncer es una de las principales causas de muertes en la actualidad (OMS 2014), cuando el organismo se enfrenta a ésta enfermedad, el sistema inmunológico también ejerce una respuesta contra esta patología, la cual generalmente causa inmunosupresión en los pacientes (Dillman *et al.* 1984).

Los principales tratamientos contra el cáncer son la cirugía, quimioterapia y radioterapia, actualmente se está en constante búsqueda de tratamientos que mejoren la calidad de vida del paciente, y para ello es muy importante considerar afectar lo menos posible al sistema inmunológico o tratar de mejorar su respuesta.

El dicloroacetato de sodio se ha estudiado para aliviar los síntomas de la acidosis láctica que complica la malaria grave, sepsis, insuficiencia cardíaca congestiva, quemaduras, cirrosis, trasplante de hígado y enfermedades mitocondriales congénitas (Stacpoole *et al.* 1992). En el tratamiento contra el cáncer actúa a nivel mitocondrial inhibiendo la piruvato deshidrogenasa quinasa, mediante esto aumenta el flujo de piruvato en la mitocondria, la promoción de la oxidación de la glucosa durante la glucólisis, lo cual invierte la apoptosis mitocondrial suprimida en el cáncer y resulta en la supresión del crecimiento tumoral (Madhok *et al.* 2010; Papandreou *et al.* 2011).

La plata coloidal fue usada ampliamente para tratar o prevenir numerosas enfermedades, su uso disminuyó con la creación de los antibióticos, sin embargo se retomó debido a que se creó resistencia bacteriana a ciertos fármacos. También se utiliza en la desinfección de alimentos y agua, su mecanismo de acción es deshabilitar las enzimas que metabolizan

oxígeno en las bacterias, lo cual resulta en la muerte de los microorganismos (Lansdown *et al.* 2010).

Recientemente se ha estudiado el efecto antitumoral de la plata coloidal, encontrando que induce apoptosis y reducción de los niveles de lactato deshidrogenasa en la línea celular MCF-7 (Franco Molina *et al.* 2010), además de haber observado en un modelo de melanoma murino la reducción del peso y tamaño de los tumores así como la prevención de la metástasis (Sierra Rivera *et al.* 2012).

En las investigaciones realizadas con estos compuestos no se han encontrado suficientes estudios que evalúen la repercusión que tienen sobre las células del sistema inmune y la producción de mediadores inmunológicos en respuesta a estos tratamientos.

El presente estudio tiene como objetivo encontrar cuáles son los efectos que tienen el dicloroacetato de sodio y la plata coloidal, sobre las poblaciones celulares linfoides, verificando si potencia la respuesta inmune o al contrario se ve disminuida por estos compuestos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema Inmunológico

Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, y su respuesta colectiva y coordinada a la entrada de sustancias externas es llamada respuesta inmune (Abbas *et al.* 2012). Este sistema se encuentra dividido en dos tipos de respuestas determinadas por la velocidad y especificidad de la reacción, las cuales son llamadas innata y adaptativa, éstas consisten en reacciones antígeno-específicas a través de los linfocitos B y T (Parkin y Cohen 2001). Considerando que la composición celular y la especificidad antigénica en el sistema inmune innato y adaptativo son distintas, cada uno de ellos ha desarrollado redes sofisticadas de comunicación las cuales permiten respuestas rápidas ante alguna lesión tisular (Visser *et al.* 2006).

La medula ósea es la fuente de las células precursoras que liberan a los constituyentes celulares del sistema inmune. La producción de las células inmunitarias es un componente de la hematopoyesis, el proceso por el cual todas las células que circulan en la sangre surgen y maduran. Un principio importante de la hematopoyesis es que hay un precursor celular individual que es capaz de dar lugar a todos los linajes de células sanguíneas desde plaquetas hasta linfocitos, esta célula precursora es conocida como célula madre pluripotente hematopoyética (Peakman 2009).

2.2 Células del sistema inmunológico

Granulocitos. Constituyen aproximadamente el 65% de todas las células blancas y su nombre se deriva de la gran cantidad de gránulos encontrados en su citoplasma. El término “célula polimorfonuclear” describe el núcleo multilobulado de los granulocitos, se ha vuelto sinónimo de los neutrófilos, que constituyen por mucho la mayoría de los granulocitos, pero el núcleo de los eosinófilos puede tener una apariencia similar. Los granulocitos circulan en la sangre y migran hacia los tejidos durante las respuestas inflamatorias (Abbas *et al.* 2012).

Monocitos y macrófagos. Los monocitos forman del 5 al 10% de las células blancas circulantes y tienen una vida media muy corta, pasan aproximadamente 24 horas en la sangre migrando al sistema extravascular y residen en los tejidos, donde son llamados macrófagos (Geneser 1999). La morfología de monocitos y macrófagos es altamente variable, generalmente son más grandes que los neutrófilos y linfocitos, tienen un solo núcleo y abundantes gránulos en su citoplasma. Existen diversas formas especializadas de macrófagos, que toman su nombre según su localización, células Kupffer en el hígado, células microgliales en el cerebro, osteoclastos en el hueso, y otros macrófagos que revisten los canales en el bazo y nódulos linfáticos (Peakman 2009).

Linfocitos. Los linfocitos forman del 25 al 35% de las células blancas y derivan su nombre por su fuerte asociación con el sistema linfático. Los linfocitos se dividen en dos subtipos B y T, presentes en sangre en un ratio aproximado de 1:5. Estos tienen funciones muy distintas y pueden ser diferenciados por la presencia de moléculas de glicoproteínas altamente especializadas en su superficie. Los linfocitos se encuentran en la sangre, órganos linfoides o tejidos y también sitios de inflamación crónica.

Los linfocitos B se diferencian dentro de la médula ósea antes de que sean liberados dentro de la circulación. El principal rol de estas células es el reconocimiento de macromoléculas (denominadas antígenos) a través de receptores de superficie (anticuerpos). Los linfocitos B pueden madurar en células plasmáticas, forma en la cual permanecen en los tejidos y funcionan como secretoras de anticuerpos solubles (Peakman 2009). Los linfocitos T consisten en poblaciones diferentes funcionalmente, los cuales son células T cooperadoras y T citotóxicas. En respuesta a estimulación antigénica, las células T cooperadoras secretan proteínas llamadas citocinas, las cuales son responsables de muchas respuestas celulares de la inmunidad innata y adaptativa (Abbas *et al.* 2012).

Linfocitos T CD4⁺. También son conocidos como células T cooperadoras (Th) son las principales células promotoras de la respuesta inmune, reconocen antígenos externos y activan otros componentes de la respuesta inmune mediada por células. También juegan un papel importante en la activación de las células B.

Las células T cooperadoras se dividen funcionalmente por el patrón de citocinas que producen. En la estimulación, los linfocitos precursores Th0 se diferencian ya sea a células Th1 o células Th2, la diferencia entre estas células es sólo en las citocinas secretadas, ya que son morfológicamente indistinguibles. Sin embargo, la respuesta que generan es muy diferente. Las células Th1 producen IL-2, que induce la proliferación de células T. El interferón es otra citocina importante producida por las células Th1, activa a los macrófagos para matar patógenos intracelulares e induce las células asesinas naturales para la citotoxicidad. Por otro lado, las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales favorecen a la producción de anticuerpos. La IL-4 induce el cambio de clase en las células B a producción de IgE y la IL-5 promueve el crecimiento de eosinófilos. IL-4 provee una retroalimentación positiva para inducir las respuestas Th2 y suprimir la diferenciación hacia Th1 (Parkin y Cohen 2001).

Linfocitos T CD8⁺. Las células citotóxicas CD8⁺ tienen actividad antiviral y posiblemente antitumoral. Ambos tipos tienen un papel fundamental en el control de patógenos intracelulares. Estas son directamente citotóxicas a las células que poseen su antígeno específico. Después de unirse a la célula blanco, las células T citotóxicas (Tc) insertan perforinas en la membrana celular, de la misma manera que las células natural killer. Los gránulos citoplasmáticos contienen granzimas que pasan a través de los poros de la célula T hacia el citoplasma de la célula blanco. Esto activa caspasas que inducen la fragmentación del DNA y apoptosis de la célula. Las células T citotóxicas también se unen a las moléculas Fas de la célula blanco mediante su Fas ligando, lo cual también activa la vía de la apoptosis. De la misma manera que Th0 se diferencia hacia Th1 y Th2, las células Tc0 se ha visto que también se diferencian hacia Tc1 y Tc2 basado en su secreción de citocinas. Estos subtipos tienen un repertorio limitado de citocinas y su rol no está claramente definido. También se ha postulado que algunas células T CD8⁺ tienen función supresora mediante la desregulación de las respuestas de linfocitos (Parkin y Cohen 2001).

Linfocitos B. Las células B producen anticuerpos, los cuales actúan potenciando los elementos del sistema innato ejerciendo funciones como neutralizar las toxinas, evitar que los organismos se adhieran a las superficies mucosas, activar el sistema del complemento,

opsonizar a las bacterias para la fagocitosis, y sensibilizar al tumor y las células infectadas por anticuerpos dependientes de ataque citotóxico de las células NK. Aunque el anticuerpo es el producto secretado de las células B activadas, con las funciones ya mencionadas, en las etapas tempranas del desarrollo de las células B es una molécula unida a la membrana que actúa como el receptor de células B. En esta etapa internaliza al antígeno y lo procesa para actuar como una célula presentadora de antígeno para las respuestas de células T (Ulmer *et al.* 2000).

Células NK. El termino células “natural killer” (NK) es una definición funcional, las células con esta actividad son capaces de lisar células infectadas por virus y células tumorales. Diferente a los linfocitos T, ellos no necesitan ser instruidos en el timo para hacer esto, de ahí el término “natural”. Al igual que los linfocitos, las células NK son bien identificadas por la presencia de glicoproteínas especializadas de superficie y también poseen un citoplasma muy granular. Además existe una población con ambas características de células T y NK, denominadas células NKT (Kumar *et al.*, 1997; Peakman 2009).

2.3 Citocinas

Son pequeños péptidos solubles usados ampliamente por el sistema inmune para influenciar el crecimiento, funcionamiento y diferenciación celular. La citocinas requieren de receptores de superficie celular específicos a través de los cuales pueden mediar su rango de acciones en diferentes células. Las acciones de las citocinas en una célula incluyen la regulación de la expresión de receptores de superficie, así como potenciar la liberación de la misma molécula. Los receptores se categorizan en clase I, que incluye receptores de interferón, y receptores de clase II, que incluyen citocinas como IL-2 e IL-4. Los receptores pueden ser liberados en formas solubles y ser detectados en la circulación (Murray *et al.* 2003; Peakman 2009).

Las citocinas son mensajeros de ligero peso molecular secretados por una célula para alterar su mismo comportamiento o de otra célula. Las citocinas mandan señales intercelulares mediante su unión a receptores de superficie celular específicos.

A pesar de que la mayoría son solubles, algunos pueden ser de unión a membrana, haciendo más difícil la diferenciación entre citocina y receptor. Tienen una amplia variedad de funciones, sus efectos biológicos dependen de cada citocina y célula involucrada, pero regularmente estas moléculas afectan la activación celular, división, apoptosis o movimiento, actúan como mensajeros autocrinos, parácrinos o endócrinos. Las citocinas producidas por los leucocitos y que tienen efecto principalmente en otras células blancas son llamadas interleucinas, aquellas que tienen actividad quimioatrayente son llamadas quimiocinas, las que causan diferenciación y proliferación de células madre son llamadas factor estimulador de colonias y aquellas que interfieren con la replicación viral son llamadas interferones (Parkin y Cohen 2001).

Un ejemplo importante de células productoras de citocinas son las células Th1 y Th2, las Th1 producen interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN- γ) y la linfoxina (LT), mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Varias otras proteínas son secretadas por las células tanto Th1 y Th2, incluyendo IL-3, factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Mosmann y Sad, 1996). Las funciones de las células Th1 y Th2 se correlacionan bien con sus citocinas distintivas. Las células Th1 están involucrados en las reacciones inflamatorias mediadas por células: varias citocinas Th1 activan las funciones citotóxica e inflamatoria. Las citocinas Th2 estimulan la producción de anticuerpos, particularmente las respuestas de IgE, y también aumentan la proliferación y la función de eosinófilos. En consecuencia, las citocinas Th2 se encuentran asociadas comúnmente a con las respuestas alérgicas fuertes (Mosmann y Sad 1996).

IFN- γ . Los interferones son la principal clase de citocina que tienen un rol particular en la inmunidad. Se dividen en tipo 1 (interferones α y β) y tipo 2 (γ o interferón inmune). Los interferones de tipo I tienen potente actividad antiviral y son producidos principalmente por fibroblastos y monocitos en reacción a una infección. Ambos interferones α y β se unen al mismo receptor celular y protegen a las células que no están infectadas induciendo la producción intercelular de moléculas que inhiben o interfieren con la producción de ARN y ADN viral. Incrementan la expresión de moléculas MHC de

clase I dando lugar a mayor reconocimiento de células infectadas por virus mediante linfocitos T citotóxicos (Parkin y Cohen 2001; Romagnani 1997).

TNF. El factor de necrosis tumoral (TNF, también conocido como TNF α) fue identificado en 1975 como una glicoproteína inducida por endotoxinas, lo que causó la necrosis hemorrágica de los sarcomas que habían sido trasplantados en ratones. TNF se encuentra implicado en una amplia gama de condiciones inflamatorias, infecciosas y malignas, y su importancia en la inflamación ha sido puesto de manifiesto por la eficacia de los anticuerpos anti-TNF o la administración de receptores de TNF solubles (RTNF) en el control de la artritis reumatoide y otras condiciones inflamatorias. Aunque las células del linaje de monocitos/macrófagos son la fuente principal de TNF en la enfermedad inflamatoria, una amplia gama de células pueden producir TNF, incluyendo los mastocitos, linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, células endoteliales, las células del músculo cardíaco, fibroblastos y osteoclastos (Bradley 2008; Tracey *et al.* 2008). TNF es reconocido como una citocina que se encarga de orquestar la diferenciación y proliferación, así como la capacidad de inducir la muerte celular. Además de la inducción de la regresión tumoral, TNF se ha implicado como el agente causante en un número de algunas patologías, incluyendo la caquexia, el choque séptico, la artritis reumatoide, la autoinmunidad, y la inducción de la expresión del VIH. Las células T activadas, macrófagos, y otras células no linfoides producen TNF, la expresión de TNF es rápidamente inducible por estímulos que activan característicamente células T, pero la expresión es transitoria, dura sólo unas pocas horas y es dependiente de la transcripción del gen *tnf* (Smyth y Johnstone 2000).

IL-4. Es una importante citocina inmunomoduladora expresada por un patrón muy restringido de células de linajes distintos ubicados en diversos lugares del cuerpo (por ejemplo, las células T circulantes vs células cebadas de los tejidos). IL-4 juega un papel esencial en la inmunidad protectora, así como en enfermedades inflamatorias (Weiss y Brown 2001).

La IL-4 actúa en la definición de la naturaleza de las respuestas inmunes. Es un polipéptido de 15 kDa con efectos en muchos tipos celulares. Su receptor es un heterodímero compuesto de una subunidad alfa, con afinidad de unión a la IL-4, y la subunidad gamma común que también es parte de otros receptores de citocinas. En las células T, la unión de IL-4 a su receptor induce proliferación y diferenciación hacia células Th2.

La necesidad de las respuestas inmunes dominadas por la IL-4 puede verse reflejada en infecciones por parásitos gastrointestinales. Una producción inapropiada de IL-4 también puede tener efectos nocivos en el contexto de enfermedades infecciosas.

El rol de la IL-4 en la prevención de la autoinmunidad mediante la desregulación de las células Th1 aún no está claro; se ha postulado que la IL-4 tiene una función regulatoria, como en casos de recuperación espontánea de encefalomiелitis autoinmune experimental que han sido asociados con una expansión de las células Th2 y un tratamiento temprano con IL-4 han sido capaces de aminorar el desarrollo subsecuente de algunas enfermedades autoinmunes (Choi y Reiser 1998).

IL-2. Es una proteína helicoidal de 15 kDa producida predominantemente por las células T activadas por algún antígeno que se une a un receptor de alta afinidad que consta de tres subunidades, IL-2Ra (CD25), IL-2RB (CD122), y GC (CD132), que se encuentran en células Treg y en linfocitos T antígeno-activados (Stauber *et al.*, 2006; Wang *et al.* 2005). Esta citocina se descubrió por primera vez hace 35 años presente en los sobrenadantes de células T activadas humanas como mediador del crecimiento y proliferación de las células T, se sabe además que induce la proliferación de las células NK, promueve la producción y proliferación de células B y es esencial para la activación de la muerte celular inducida, la cual es importante para la homeostasis y la eliminación de células autoreactivas potencialmente dañinas, en parte por un mecanismo dependiente de Fas y Fas-L. IL-2 también conduce al desarrollo de células Treg CD4⁺ FOXP3⁺ las cuales tienen una función supresora y se encargan de mediar la tolerancia. También se ha descrito el rol de la IL-2 en la promoción de la diferenciación de células Th1 y Th2, mientras inhibe el desarrollo de las células Th17 y las células T foliculares (Liao *et al.* 2013).

IL-6. Es una proteína de aproximadamente 26 kDa de peso molecular, juega un papel en los diversos sistemas de órganos. El receptor de IL-6 consta de 2 cadenas peptídicas, designadas la gp130 y la gp80. La cadena de polipéptido gp80 es la subunidad de unión a ligando, mientras que gp130 traduce la señal. Las células que responden a IL-6 incluyen células B, células T, células neuronales, células cardíacas y hepatocitos. Esta citocina es producida por diferentes células incluyendo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y T, células endoteliales y queratinocitos en respuesta a diversos estímulos (ej; IL-1, TNF y PDGF). Se ha demostrado que la IL-6 induce la síntesis de proteínas en respuestas de fase aguda en hepatocitos, diferenciación terminal de células B a células plasmáticas productoras de anticuerpos, diferenciación de monocitos a macrófagos y crecimiento de células madre hematopoyéticas (Barton 1996; Diehl y Rincón 2002).

Se ha demostrado que la IL-6 es necesaria para la síntesis de anticuerpos antígeno-específicos, tanto para la respuesta primaria como para la de anamnesis.

IL-6 ha demostrado ser un factor importante en la diferenciación y el mantenimiento de células T citolíticas, también se sabe que potencia la actividad de las células natural killer, siendo importante en los mecanismos de defensa del huésped que envuelven actividades citolíticas (Barton 1996). La producción de IL-6 en células linfoides y no linfoides hace que esta citocina sea importante para diversos aspectos de la respuesta inmune aún en ausencia de alguna citocina polarizante, la IL-6 dirige la diferenciación de células CD4⁺ hacia fenotipo Th2 cuando las células se diferencian en presencia de IL-6 producen grandes cantidades de IL-4 no así de IFN (Diehl y Rincón 2002).

IL-10. Es una proteína de 160 aminoácidos con un peso molecular de 18.5 kDa que existe como un homodímero de 37 kDa, pertenece a la familia de clase II de las citocinas de α -hélice, que está compuesta por los interferones de tipo I: interferón γ e IL-10.

Es producida por macrófagos activados, células dendríticas, linfocitos B, varios subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ y recientemente se ha reportado que también se produce por células reguladoras. (Mege *et al.*, 2006; Couper *et al.* 2014).

Muchas bacterias, virus, parásitos, o sus productos son capaces de estimular la producción de esta citocina en las células del huésped. Esta citocina es un importante regulador de la inmunidad innata, interfiere con la producción de mediadores inflamatorios por los

neutrófilos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, así como la regulación positiva de la expresión de moléculas que amplifican el efecto anti-inflamatorio de la interleucina. Además, la IL-10 afecta la diferenciación de las células dendríticas derivadas de monocitos, la inducción de la apoptosis en células dendríticas plasmacitoides, y altera la migración de las células dendríticas mediante la modulación de la expresión de superficie de receptores de quimiocinas. La IL-10 afecta directamente a la función de las células T CD4⁺ mediante la inhibición de la expresión de la IL-2, factor de necrosis tumoral (TNF), IL-5 y el receptor de quimiocinas CXCR4 (Mege *et al.*, 2006; Saravia y O'Garra 2010).

IL-17A. Esta citocina es el miembro fundador de la familia de las citocinas de IL-17, que incluye IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, y la IL-17F. Es una citocina efectora producida por células del sistema inmune innato y adaptativo, además de ser producida por las células Th17, también se produce por una variedad de tipos de células como las células $\gamma\delta$ T, NKT, células NK, neutrófilos, y eosinófilos. Posee propiedades proinflamatorias y tienen efecto sobre una amplia gama de tipos celulares para inducir la expresión de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, GM-CSF, G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CXCL10), y metaloproteinasas (IL-17 y células TH17).

IL-17A es una citocina clave en el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos, también se ha reportado como un factor que contribuye en la formación de centros germinales de los folículos linfoides (Korn *et al.*, 2009; Iwakura *et al.* 2008). Uno de los papeles de esta citocina en procesos infecciosos, es que puede actuar de manera sinérgica con otras citocinas como IL-1, IL-6 y TNF para promover la activación de neutrófilos infiltrantes de tejido con el fin de eliminar patógenos extracelulares (Cua y Tato 2010).

2.4 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)

El dicloroacetato es uno de los organohaloides a los que el humano ha estado expuesto crónicamente, es también un metabolito en la biotransformación de varios fármacos y ha sido administrado vía oral y parenteral por varias décadas como droga de investigación para numerosos desordenes metabólicos y cardiovasculares (Stacpoole *et al.* 1998). El dicloroacetato es una pequeña molécula de 150 Da lo que explica en parte su alta biodisponibilidad y el hecho de que puede penetrar en sitios de quimioterapia tradicionales, incluyendo el cerebro (Michelakis *et al.* 2008).

El principal sitio de acción del DCA-Na es el complejo enzimático (PDC) piruvato deshidrogenasa (PDH), localizado en la membrana mitocondrial interna. PDC cataliza la descarboxilación reversible del piruvato a acetil coenzima A (CoA), el cual es el paso limitante en la oxidación aeróbica de la glucosa, piruvato y lactato en células animales. La capacidad de la mitocondria para oxidar sustratos y producir adenosintrifosfato (ATP) por fosforilación oxidativa es integra a la homeostasis normal y la habilidad de las células a sobrevivir. DCA-Na fue definido como un activador de la piruvato deshidrogenasa, ahora se conoce que sus acciones imitan el piruvato al inhibir la acción de las PDKs (Stacpoole *et al.* 1998).

En años recientes, el DCA ha atraído la atención como potencial terapia simple y económica para tumores glucolíticos, mientras que produce limitados efectos secundarios en órganos oxidativos sanos. El interés en esta droga por la comunidad científica, los pacientes de cáncer y el medio fue retomado en el 2007, después de que un grupo de la Universidad de Alberta reporto que el DCA únicamente es tóxico a las líneas celulares cancerosas y que inhibió el crecimiento de tumor de pulmón A549 en ratas. Desde entonces los siguientes reportes de la eficacia del DCA *in vitro* e *in vivo* revelaron interesantes características, las cuáles distinguen al DCA de la mayoría de las drogas desarrolladas como agentes contra el cáncer (Michelakis *et al.* 2008).

En un estudio evaluaron el efecto antitumoral del DCA en las líneas AN3CA, SKUT1B, RL95-2, HEC1A y HEC1B, encontrando una reducción de la viabilidad celular de manera dependiente de dosis principalmente en la dosis de 10mM, no así en la línea control 293T de células epiteliales de riñón (Wong *et al.* 2008). En el trabajo de Madhok y colaboradores se observó una mínima inducción de apoptosis a las 24 y 48 horas en dos líneas celulares control no cancerosas HB2 y 293, en cuanto a las líneas celulares de cáncer colorectal utilizadas en su estudio encontraron inducción de arresto en la fase G2 del ciclo celular además de una reducción de los niveles de lactato extracelular y despolarización del potencial de la membrana mitocondrial (Madhok *et al.* 2010).

Otra investigación, realizada por nuestro equipo de trabajo, confirma el efecto antitumoral del dicloroacetato de sodio en la cual se aplicó el tratamiento en diversas líneas de cáncer, resultando ser B16F10 la más afectada induciendo muerte celular por la vía de apoptosis, además de que causó una reducción en la capacidad de invasión celular. Dentro de este mismo trabajo se administró este agente como tratamiento a ratones de la cepa C57BL/6 a los cuales previamente se les indujo melanoma y se logró una reducción del peso y volumen de los tumores además de que previno la metástasis hacia otros órganos (Franco Molina *et al.* 2012).

En 1996 se realizó un estudio para evaluar la mutagenicidad del DCA. Una de las evaluaciones fue mediante la prueba Ames, las dosis empleadas fueron 0.333, 0.667, 1.00, 3.33 y 5.00mg de DCA por placa, en todos los casos no se reportaron efectos mutagénicos del DCA en las cepas TA100 y WP2uvrA de *Salmonella*. Además realizaron otra prueba para observar si el DCA causaba mutaciones en un modelo de linfoma murino, usando un rango de dosis de 9.77 a 5000 $\mu\text{g/mL}$, en todas las dosis empleadas del dicloroacetato se observaron 134 ± 14 colonias mutantes y 471 ± 2 colonias viables, en contraste con un control que utilizaron de metilcolantreno a una dosis de 4 $\mu\text{g/mL}$ con el cual se observaron 529 colonias mutantes y 370 colonias viables. Un tercer estudio fue realizado en ovarios de hámster para identificar aberraciones cromosómicas, las concentraciones que utilizaron de DCA fueron 500, 1250, 2500, y 3750 $\mu\text{g/mL}$. Observaron con la dosis de 1250 $\mu\text{g/mL}$ roturas simples de cromátidas o dicéntricos en 0.5% de las células y ninguna célula presentó más de una aberración. No se presentaron aberraciones cromosómicas en las

dosis de 2500 0 3750 $\mu\text{g/mL}$ de DCA. Además realizaron un ensayo de micronúcleos en ratas, las cuales fueron expuestas a una dosis de 1100mg/kg, en el cuál no se encontraron efectos mutagénicos producidos por el DCA (Fox *et al.* 1996).

La mayoría de los cánceres se caracterizan por la glucólisis aeróbica (Gly), es decir, que utilizan la glucólisis para la producción de energía, a pesar de que el oxígeno está presente. En las células y tejidos normales, no se encuentra presente este aumento de energía, únicamente en el músculo esquelético después de haber realizado ejercicio. Por otra parte, en la mayoría de los tumores sólidos encontramos un estado característico de proliferación y antiapoptótico el cual está asociado a un ambiente glicolítico. El aumento en la entrada de piruvato hacia la mitocondria ya sea por DCA o mediante la inhibición de LDH, promueve la oxidación de la glucosa, incrementando la apoptosis y disminuyendo la proliferación y crecimiento del tumor.

Los mediadores pro-apoptóticos, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis, se encuentran protegidos dentro de la mitocondria. Cuando existe una despolarización el poro de transición mitocondrial (MTP) se abre, éstos son liberados hacia el citoplasma y pueden inducir apoptosis, también es posible que ocurra este fenómeno sin la apertura del MTP.

La despolarización mitocondrial y un aumento de ROS están asociadas con la apertura del MTP. El potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS son dependientes del flujo de electrones bajo la cadena transportadora de electrones, los cuales son dependientes de la producción de donadores de electrones del ciclo de Krebs (NADH, FADH₂).

Bloqueando la entrada de piruvato a la mitocondria y por consecuencia la producción de acetyl-CoA, inhiben el ciclo de Krebs y la apertura del MTP y la apoptosis.

2.5 Plata coloidal

La plata es un elemento metálico que se encuentra en el medio ambiente como un metal blando, en su forma metálica se utiliza para la fabricación de joyería, equipo electrónico y materiales dentales. Es el elemento número 47 de la tabla periódica, su peso atómico es de 107.87 y su símbolo es Ag, posee un punto de fusión de 961.78 °C y su punto de ebullición es de 2162 °C. Los humanos se han encontrado expuestos a la plata y sus compuestos durante cientos de años ya sea a través del medio ambiente, la industria o a través del uso de medicamentos que contienen este elemento (Wadhera y Fung, 2005).

También se encuentra presente en el cuerpo humano en baja concentración a través de la inhalación de partículas en el aire, la contaminación del agua potable y la dieta. Su mecanismo de acción antimicrobiano consiste en unirse a residuos de proteínas en las membranas celulares de las bacterias sensibles, hongos y protozoos y es absorbido intracelularmente por pinocitosis; seguido de la desnaturalización e inactivación de proteínas y enzimas esenciales, incluyendo RNA-asas y DNA-asas. La plata metálica es inerte en la presencia de tejidos humanos pero ioniza en la presencia de humedad, fluidos corporales, secreciones, liberando iones de plata los cuales muestran una fuerte afinidad por los grupos sulfhidrilo y otros ligandos aniónicos de proteínas, membranas celulares, y restos de tejido (Lansdown 2010).

La plata coloidal es el resultado de un proceso electrolítico que se lleva a cabo en agua destilada que atrae partículas submicroscópicas de plata, es una solución que contiene partículas de plata dentro del rango de 0.01 a 0.001 μm de diámetro, las cuales permanecen suspendidas debido a que se encuentran eléctricamente cargadas (Wadhera y Fung, 2005). Este subproducto de la plata ha sido utilizado como un agente antimicrobiano y desinfectante, desde 1990 resurgió su uso como una medicina alternativa debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos, y a la búsqueda continua de nuevos agentes antimicrobianos. La plata coloidal ha sido usada como desinfectante de alimentos y agua en México. A pesar de que el uso de la plata coloidal como agente antimicrobiano es reconocido, hay escasos reportes acerca de su uso como agente antitumoral, entre estos,

hay un reporte del efecto antiproliferativo que tienen las partículas de plata en las células de glioblastoma humano (U251) *in vitro* (AshaRani *et al.* 2009).

Estudios han demostrado que la plata coloidal tiene un efecto citotóxico dependiente de dosis en la línea MCF-7 de cáncer de mama a través de la inducción de la apoptosis, sin afectar la viabilidad de células normales PBMC usadas como control; lo cual demuestra que puede ser un potencial agente alternativo en el cáncer de mama en humanos (Franco-Molina *et al.* 2010).

Otra evidencia acerca su efecto antitumoral, fue la demostración del efecto citotóxico en la línea celular tumoral B16F10, aunado a que *in vivo* en un modelo de melanoma murino tratado con Ag C o Ag NPs hubo una reducción significativa del tamaño de los tumores además de una prevención de metástasis hacia músculo, cavidad peritoneal, intestino e hígado comparado con el grupo control (Sierra Rivera *et al.* 2013).

2.6 Óxido nítrico en el sistema inmune

El sistema inmune innato está encargado de desencadenar diversas respuestas en defensa del huésped, entre ellas la de fagocitar bacterias o microorganismos por parte de neutrófilos o macrófagos, la liberación de péptidos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas o especies reactivas de oxígeno (ROS). Otros mecanismos antimicrobianos requieren la síntesis de proteínas de *ново*, como por ejemplo la producción de óxido nítrico a través de la NO sintasa tipo 2 (iNOS o NOS2), la eliminación del aminoácido L-triptofano por la indoleamina-2,3-dioxigenasa o la privación del hierro de los fagosomas a través de la regulación positiva de ferritina citosólica o la regulación negativa de los receptores transferrina. Estos procesos son inducidos por el IFN- γ , las células del sistema inmune encargadas de inducir la producción de NOS2, son macrófagos, células NK y células NKT (Bogdan *et al.* 2010).

El óxido nítrico es producido por esta enzima, NOS2, es un gas inodoro e incoloro y poco soluble importante en los procesos fisiológicos y patológicos, tiene avidez por compartir su electrón no apareado, posee una gran inestabilidad electrónica, y en consecuencia, es muy reactivo.

Este gas es producido en cantidades abundantes bajo condiciones asociadas a procesos inflamatorios, reconocido factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. La síntesis de ON se realiza por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina que produce ON y L-citrulina, requiriendo la presencia de dos cofactores, el oxígeno y el fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH). Existen tres formas de NOS2, denominadas constitutivas y dependientes del calcio (cNOS), que son la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS), las cuales sintetizan NO en condiciones normales, y una inducible e independiente del calcio (iNOS), que no se expresan o lo hacen muy débilmente en condiciones fisiológicas (Yassin *et al.* 2008).

2.7 *Drosophila melanogaster*

Las especies del género *Drosophila* (moscas de la fruta) han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de daños genotóxicos o mutagénicos (Kellermann *et al.* 2009). Entre las especies utilizadas como modelos de experimentación en investigaciones biológicas, *Drosophila melanogaster* es una de las pocas especies que cumple con muchos de los requisitos deseables para un modelo experimental en diversos campos de la biología como la neurobiología, la fisiología, la genética, la cronobiología, la genética funcional y la endocrinología (Matthews *et al.*, 2005; Venken y Bellen 2005; Mackay y Anholt, 2006).

Dentro de las ventajas de la utilización de este modelo se encuentran las siguientes:

- Tiene un tiempo generacional corto
- Es fácil de manipular y criar en el laboratorio
- Las condiciones para su cultivo son simples, económicas y fáciles de controlar
- Se dispone de una extensa base de datos genéticos
- Es posible contar con una extensa colección de mutantes

D. melanogaster es un insecto holometábolo que tiene un ciclo de vida en laboratorio de alrededor de 10 días cuando se cría en un medio nutritivo y a temperatura constante de 25° C. El ciclo de vida comienza con una etapa embrionaria, el huevo, que generalmente eclosiona transcurridas 18 a 24h desde su puesta. No obstante, las hembras pueden retener sus huevos y depositarlos más tarde en un estado de desarrollo avanzado si no dispone de un sustrato de oviposición adecuado, disminuyendo así el tiempo de eclosión. A continuación, el estadio larval es la etapa principal de alimentación y consta de 3 estadios que duran, en conjunto, aproximadamente 4 días. Transcurrido este tiempo, la larva deja de alimentarse, entra en el estadio de pupa y comienza el proceso de metamorfosis. Esta etapa dura aproximadamente 3 días, al cabo de los cuales emerge una mosca adulta que alcanza la madurez sexual a las 3h los machos y a las 7h las hembras (Roberts, 1998). Los adultos viven alrededor de 35-40 días, aunque el tiempo de vida difiere considerablemente entre individuos y depende de las condiciones ambientales del laboratorio.

3. JUSTIFICACIÓN

Se han realizados diversos estudios en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. acerca de la plata coloidal y el dicloroacetato de sodio en el tratamiento para el cáncer, sin embargo no se conocen los efectos que producen en el sistema inmune, por lo que surge la inquietud de descubrir de qué manera actúan estos compuestos sobre las células del sistema inmune, con la finalidad de establecer de qué manera estos compuestos afectan la respuesta inmune, para utilizar dichos tratamientos de manera más controlada y eficaz para el paciente.

4. HIPÓTESIS

El uso del dicloroacetato de sodio o la plata coloidal afectan las células mononucleares de sangre periférica y la producción de mediadores inmunológicos *in vitro*.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del dicloroacetato de sodio o la plata coloidal sobre las células mononucleares de sangre periférica humana y la producción de mediadores inmunológicos.

5.2 Objetivos Particulares

1. Determinar el efecto del dicloroacetato de sodio o la plata coloidal sobre la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica humana.
2. Evaluar la producción de las citocinas TH1, TH2 y TH17 en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con dicloroacetato de sodio o plata coloidal.
3. Determinar las poblaciones celulares $CD3^+$, $CD3^-CD19^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ y $CD16^+CD56^+$ en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con dicloroacetato de sodio o plata coloidal.
4. Determinación de la actividad fagocítica en macrófagos tratados con dicloroacetato de sodio o plata coloidal.
5. Evaluar los efectos del dicloroacetato de sodio o la plata coloidal sobre el fenotipo de diferentes especies de *D. melanogaster*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)

Se obtuvieron 10mL de sangre venosa de donadores voluntarios sanos, la cual se colectó en tubos de plástico universal que contienen 10U/mL de heparina como anticoagulante (Green et al., 2002).

Posteriormente la sangre fue diluida 1:1 con PBS 1X, a los tubos de 15mL se añadió 7mL de Ficoll Hypaque y 7mL de la sangre diluida con PBS, con cuidado de no atravesar la barrera del Ficoll, posteriormente se centrifugaron a 1600 rpm durante 30 min a una temperatura de 22°C.

Después de la centrifugación la capa de células mononucleares fue colocada en un tubo de 15mL, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se depositaron en una caja de cultivo de 75cm³ con 5mL de medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% dejándolas incubar durante la noche a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂ para dejar que los monocitos se adhirieran en el plástico. Posteriormente se obtuvieron las células no adherentes y se procedió a sembrar 1×10^6 células por pozo en placas de doce pozos, en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%.

6.2 Dicloroacetato de sodio (DCA-Na)

El dicloroacetato de sodio (Hymera Lab) es una sal cuyo peso molecular es de 150.92451, soluble en agua, su estado físico es en polvo, fue disuelto en medio de cultivo RPMI-1640, y filtrado para su posterior utilización a través de filtros de 0.2 µm de diámetro (Milipore, USA).

6.3 Plata coloidal (Ag C)

La solución de plata coloidal al 0.35% fue filtrada a través de un filtro de 0.2 μ M de diámetro (Millipore, USA) y disuelta en medio de cultivo RPMI-1640 para su empleo.

6.4 Evaluación de la viabilidad en CMSP tratadas con DCA-Na o Ag C mediante la técnica de MTT

Para esta evaluación se sembraron 1×10^6 células por pozo en placas de doce pozos por triplicado, en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, como se describió anteriormente.

En los siguientes grupos se evaluó la viabilidad de las células pasadas 72 horas de incubación:

1. Grupo control
2. Tratamiento DCA Na 300 mM/mL
3. Tratamiento AgC 10.5 ng/mL

El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Mosmann 1983).

Pasadas las 72h de incubación se adicionaron 20 μ L de MTT/ pozo, a una concentración final de 5 mg/mL suspendido en PBS 1X, se incubó la placa a 37°C por 2 horas, posteriormente se centrifugó la placa y se eliminó el medio evitando remover las sales de formazán, finalmente se añadieron 200 μ L/pozo del dimetil sulfóxido (DMSO). Las absorbancias fueron determinadas en un espectrofotómetro a 570 nm (Microplate autoreader EL311 BIOTEK, Instruments, Inc).

6.5 Evaluación la producción de las citocinas TH1, TH2 y TH17 en CMSP

Se determinó la producción citocinas TH1 y TH2 en CMSP tratadas con dicloroacetato de sodio o plata coloidal, mediante citometría de flujo (BD Biosciences, USA, 2013).

Para el análisis de las citocinas solubles de las muestras se seleccionó el kit BD™ CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit de Becton Dickinson and Company BD Biosciences®. Este kit nos permite medir simultáneamente siete citocinas muestra. Las citocinas que fueron cuantificadas con este kit son: IL2, IL4, IL6, IL10, INF- γ , TNF e IL-17A.

Este ensayo está basado en un método para capturar los analitos (componente químico cuya concentración se desea conocer) solubles con microesferas captadoras de un tamaño y fluorescencia conocidos. Cada microesfera captadora está conjugada con un anticuerpo específico. El reactivo de detección está formado por una mezcla de anticuerpos conjugados con R-Ficoeritrina (PE). Cuando las microesferas captadoras y el reactivo de detección se incuban con las muestras se produce un sandwich complejo (microesfera captadora + analito + reactivo de detección) (BD Biosciences, USA, 2013).

Los componentes que constituyen el kit son:

Microesferas captadoras:

A1: Microesferas captadoras humanas para IL-2

A2: Microesferas captadoras humanas para IL-4

A3: Microesferas captadoras humanas para IL-6

A4: Microesferas captadoras humanas para IL-10

A5: Microesferas captadoras humanas para TNF

A6: Microesferas captadoras humanas para IFN- γ

A7: Microesferas captadoras humanas para IL-17-A

B: Reactivo de detección humano Th1/Th2/Th17 PE

C: Reactivo estándar humano de citocinas Th1/Th2/Th17

Reactivos de calibración:

D: Microesferas de calibración del citómetro

E1: Marcador del control positivo en PE

E2: Marcador del control positivo en FITC (Fluorescein Isothiocianato)

F: Solución de lavado

G: Diluyente para muestras

H: Solución para muestras de suero

Preparación de la curva estándar:

Los estándares para detección de citocinas humanas Th1/Th2/Th17 se encuentran liofilizados y deben ser reconstituidos y realizar diluciones seriadas inmediatamente antes de mezclarlos con las perlas de captura y el reactivo de detección PE.

Procedimiento:

Para reconstituir y diluir de forma serial los estándares:

1. Abrir un vial del reactivo estándar liofilizado para detección de citocinas Th1/Th2/Th17 humanas. Transferir las esferas estándar en un tubo cónico de polipropileno de 15 mL. Etiquetar este tubo con el nombre de “Top Standard.”
2. Reconstituir los estándares con 2 mL del diluyente.
 - a. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 - b. Mezclar cuidadosamente con pipeta, no con vortex.
3. Etiquetar 8 tubos de 12 x 75 mm como sigue: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.
4. Pipetear 300 µL del diluyente a cada uno de estos tubos.
5. Realizar las diluciones seriales:
 - a. Transferir 300 µL del tubo Top Standard al tubo etiquetado como “1:2” y mezclar delicadamente con pipeta.
 - b. Continuar realizando diluciones seriadas transfiriendo 300 µl del tubo 1:2 al tubo 1:4 y así sucesivamente hasta el tubo 1:256.
 - c. Mezclar solamente con pipeta. No vortexear.

6. Preparar un tubo de 12 x 75 mm conteniendo solamente el diluyente, el cuál servirá como control negativo de 0-pg/mL.

A. Preparación de la curva estándar:

Se reconstituyó el reactivo estándar para humano Th1/Th2/Th17 estándar (C) con 2 mL del diluyente para las muestras (G) en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. Este tubo se etiquetó con el nombre de “top standard” y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El reactivo estándar para humano Th1/Th2/Th17 se compone de una concentración conocida de cada una de las citocinas que se analizó.

Se etiquetaron otros 8 tubos de 12 x 75 mm con la siguiente nomenclatura: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.

Se siguió con la adición de 300 µL de diluyente para muestras (G) a cada uno de los tubos anteriores y se fueron desarrollando las diluciones en serie transfiriendo 300 µL desde el tubo “top standard” al tubo 1:2 y de este al 1:4 y así sucesivamente hasta terminar con el tubo 1:256.

Concluimos preparando un último tubo de 12 x 75 mm al que sólo se añade el diluyente para muestras (G). Este tubo será utilizado como control negativo (0 pg/ml).

B. Preparación de la mezcla de microesferas:

Las microesferas captadoras se presentan en recipientes individuales (A1-A7). Se determinó el número de tubos de ensayo necesarios (estándar, control y uno por muestra).

C. Protocolo:

1. Se etiquetó un tubo de 1.5 mL por cada muestra biológica con el código del grupo a evaluar y uno para cada punto de la curva estándar.
2. Se añadió 50 µL de “mezcla de microesferas captadoras” a todos los tubos del ensayo.
3. Se añadió 50 µL de cada punto de la curva estándar en el tubo correspondiente.
4. Se añadió 50 µL de cada muestra de sobrenadante de cultivo celular en el tubo correspondiente.

5. Se añadió 50 μ L del reactivo de detección humano Th1/Th2/Th17 PE (B) en todos los tubos.
6. Se incubaron todos los tubos durante 3 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
7. Se añadió 1 mL de solución de lavado (F) a cada tubo y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos.
8. Se retiró el sobrenadante y se añadió nuevamente 300 μ L de solución de lavado (F) a cada tubo.

D. Adquisición de las muestras:

Para la adquisición de las muestras se utilizó el citómetro de flujo personal Accuri C6 de Becton Dickinson. Se realizó la plantilla para el análisis de las muestras en el programa BD Accuri C6, el número de eventos analizado para cada tubo (control negativo, estándares y muestras) fue de 10,000. Todos los tubos fueron adquiridos, para su posterior análisis cuantitativo por el FCAP Array software.

6.6 Determinación de poblaciones celulares CD3⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y CD16⁺CD56⁺

Para esta prueba se utilizó el BD Multitest™ IMK Kit, el cuál es un kit de reactivos de cuatro colores para inmunofluorescencia directa utilizable con un citómetro de flujo adecuadamente equipado para identificar y determinar los porcentajes de las siguientes subpoblaciones de linfocitos humanos maduros: linfocitos T (CD3⁺), linfocitos B (CD19⁺), linfocitos T colaboradores/inductores (CD3⁺CD4⁺), linfocitos T supresores citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) y linfocitos citolíticos naturales (NK) (CD3⁺CD16⁺ o CD56⁺).

Se estableció un cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana, sembrando 1 x 10⁶ células por pozo en placas de doce pozos, en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, teniendo los siguientes grupos:

1. Grupo control
2. Tratamiento DCA Na 300 mM/mL
3. Tratamiento AgC 10.5 ng/mL

Cuando se añade la muestra al reactivo, los anticuerpos marcados con fluorocromos presentes en el reactivo se unen específicamente a los antígenos de superficie de los leucocitos.

Tinción de las células:

1. Para cada muestra, rotular dos tubos de 12 x 75 mm con el número de identificación de la muestra. Utilizar letras como la A y la B para diferenciar los dos tubos.
2. Pipetear 20 µL de reactivo CD3/CD8/CD45/CD4 BD Multitest en el fondo de cada tubo rotulado A.
3. Pipetear 20 µL de reactivo CD3/CD16 + CD56/CD45/CD19 BD Multitest en el fondo de cada tubo rotulado B.
4. Pipetear 50 µL de muestra de la suspensión celular (1x 10⁶ células) bien mezclada en el fondo de cada tubo.

5. Tapar los tubos y agitarlos suavemente para mezclar el contenido.

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (entre 20 y 25 °C) en la oscuridad.

Pasado el tiempo de incubación llevar las muestras al citómetro de flujo para ser adquiridas.

6.7 Preparación de cultivos de macrófagos murinos

Los macrófagos peritoneales se colectaron mediante lavado de la cavidad peritoneal de ratones de la cepa BALB/C, con medio RPMI 1640 frío inmediatamente después de sacrificar al ratón mediante dislocación cervical. La suspensión celular se lavó dos veces con este medio, y fue ajustada a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB en placas de seis pozos (Tamez *et al.*, 2001). Esta metodología fue utilizada para la obtención de las células para la prueba de viabilidad celular en macrófagos murinos así como para el análisis de la capacidad fagocítica.

6.8 Evaluación de la viabilidad celular en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C

Para esta evaluación se requiere sembrar 1×10^6 células por pozo en placas de seis pozos por triplicado, en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, como se describió anteriormente.

En los siguientes grupos evaluamos la viabilidad de las células pasadas 72 horas de incubación:

1. Grupo control
2. Tratamiento DCA Na 300 mM/mL
3. Tratamiento AgC 10.5 ng/mL

Después del tiempo de incubación, se realizó una tinción con yoduro de propidio para determinar el porcentaje de células viables en cada grupo, se obtuvieron las células de cada placa despegándolas con tripsina, se colocaron en tubos de ensayo de 12 x 75mm y fueron centrifugadas durante 10 min a 1600 rpm para realizarles dos lavados con PBS 1X, las células se resuspendieron en 100µL de PBS y posteriormente se agregaron 5µL de yoduro de propidio dejándolas incubar durante 20 min protegidas de la luz, para después llevar a un volumen final de 500µL de PBS y adquirir las muestras en un citómetro de flujo (Dengler et al., 1995).

6.9 Ensayo de fagocitosis mediante FITC-Dextran

La capacidad fagocítica de los macrófagos murinos se evaluó mediante la capacidad de captación del reactivo FITC-Dextran. Se incubaron 1×10^6 células en placas de 6 pozos con 2mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Pasadas 72 horas de incubación en presencia de los siguientes tratamientos:

1. Control 37°C
2. Control 4°C
3. Tratamiento DCA Na 300 mM/mL
4. Tratamiento AgC 10.5 ng/mL

Una serie de pozos fueron incubados por 1hr en presencia de 20µg/mL de FITC-Dextran a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Como controles se incubaron una serie de pozos con las células en medio sin FITC-Dextran (con H₂O) durante 1hr a 37°C, y a la vez una serie de pozos con la misma concentración celular se incubaron con 20µg/mL de FITC-Dextran a 4°C, bajo estas condiciones se ve inhibido el proceso de fagocitosis.

Después del tiempo de incubación las células fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frio suplementado con 1% de suero fetal bovino para eliminar el exceso de FITC-Dextran que se encontraba en el medio o adherido inespecíficamente a la superficie de las células.

Posterior a los lavados, las células se resuspendieron en un volumen final de 500µL y se adquirieron por citometría de flujo.

6.10 Ensayo de óxido nítrico en macrófagos murinos

El óxido nítrico es sintetizado en sistemas biológicos a través de la enzima Sintasa de Óxido Nítrico (NOS). NOS es una compleja molécula que actúa sobre el oxígeno, arginina y NADPH para producir NO, citrulina y NADP⁺. Para la determinar si en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos murinos existía la presencia de subproductos del óxido nítrico, realizamos una evaluación mediante un kit comercial Nitrate Nitrite Assay (Cayman).

Se obtuvieron los macrófagos murinos con la técnica previamente descrita y se sembraron 1×10^6 células por pozo en placas de seis pozos por triplicado, en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, como se describió anteriormente.

En los siguientes grupos evaluamos la presencia de nitrato en los sobrenadantes del cultivo pasadas 72 horas de incubación:

1. Grupo control
2. Tratamiento DCA Na 300 mM/mL
3. Tratamiento AgC 10.5 ng/mL

Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron las placas y se colectaron 200 µL del sobrenadante de cultivo celular de cada una de las muestras, posteriormente se congelaron a -20°C hasta el día de su evaluación.

La metodología del Kit Nitrate Nitrite Assay (Cayman), consiste en varios pasos, el primero es la conversión de nitrato a nitrito utilizando la nitrato reductasa, el segundo paso es la adición de los reactivos de Griess los cuales convierten el nitrito en un compuesto morado. La medición de la absorbancia por espectrofotometría de este compuesto determina la concentración de nitrito.

Los componentes del kit y su preparación son:

1. Buffer de ensayo Nitrato/Nitrito

Diluir el contenido del frasco de Buffer de ensayo en 100mL de agua ultra purificada (Milli-Q o equivalente).

2. Enzima Nitrato Reductasa

Reconstituir el contenido del frasco con 1.2mL del buffer de ensayo. Mantener en hielo mientras se utiliza.

3. Cofactores Nitrato Reductasa

Reconstituir el contenido del frasco con 1.2mL del buffer de ensayo. Mantener en hielo mientras se utiliza.

4. Estándar de nitrato

Reconstituir el contenido del frasco con 1mL del buffer de ensayo. Vortexear y mezclar suficientemente para asegurar colectar todo el polvo incluyendo el de la tapa.

5. Estándar de nitrito

Reconstituir el contenido del frasco con 1mL del buffer de ensayo. Vortexear y mezclar suficientemente para asegurar colectar todo el polvo incluyendo el de la tapa.

6. Reactivos de Griess R1 y R2

Están listos para usarse, no hay que adicionarles ningún reactivo.

6.11 Medición de nitrato y nitrito

Preparación de la curva estándar

Se debe preparar una curva estandar de nitrato para poder cuantificar las concentraciones de nitrato y nitrito presentes en las muestras. En un tubo limpio colocar 0.9 mL del buffer de ensayo. A esto, añadir 0.1 mL del estandar de nitrato ya reconstituido y vortexear. La concentración del stock estandar es de 200 μ M. Usar este estándar para la preparación de la curva estándar de nitrato como se describe en la siguiente tabla. La curva estándar para el nitrato es preparada añadiendo los reactivos en los pozos de la placa de la manera siguiente:

Tabla 1. Concentraciones estandar de nitrato. *La concentración es calculada para un volumen final de 200 μL después de añadir los reactivos de Griess.

Pozo	Estandar de Nitrato (μL)	Buffer de ensayo (μL)	Concentración final de Nitrato* (μM)
A1,A2	0	80	0
B1,B2	5	75	5
C1,C2	10	70	10
D1,D2	15	65	15
E1,E2	20	60	20
F1,F2	25	55	25
G1,G2	30	50	30
H1,H2	35	45	35

Realización del ensayo:

1. Añadir 200 μL de agua o buffer de ensayo a los pozos blanco.
2. Añadir 80 μL de muestra o de las diluciones de las muestras. El volumen final debe ajustarse a 80 μL usando el buffer de ensayo.
3. Añadir 10 μL de los cofactores a cada uno de los pozos (estándares y muestras).
4. Añadir 10 μL de la Nitrato Reductasa a cada uno de los pozos (estándares y muestras).
5. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente durante una hora. Nota: El tiempo de incubación se deberá incrementar a dos horas cuando se este analizando medio de cultivo celular.
6. Después del tiempo de incubación, añadir 50 μL del reactivo de griess R1 a cada uno de los pozos (estándares y muestras).
7. Inmediatamente después añadir 50 μL del reactivo de griess R2 a cada uno de los pozos (estándares y muestras).
8. Permitir que aparezca el color por 10 minutos a temperatura ambiente. No es necesario cubrir la placa.
9. Leer las absorbancias a 540nm o 550nm utilizando un lector de placas.

6.12 Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Se realizaron las pruebas de mutagenicidad en este modelo utilizando tres especies diferentes las cuales fueron *wild type*, *curly* y *evony*. Las moscas adultas de las diferentes líneas se criaron en recipientes (tubos o frascos de vidrio) con medio de cultivo estándar. Este medio de cultivo es alimento preparado a base de harina de maíz y azúcar, con el agregado de agar. Todas las líneas se mantuvieron en una cámara a una temperatura de 25 ± 1 °C y humedad 60-70% constantes. Se colocaron aproximadamente 20 moscas adultas machos y 20 hembras de cada especie por frasco para que se reprodujeran, posteriormente cuando las hembras habían ovipositado los embriones se retiraron todas las moscas adultas. Se adicionó cada uno de los tratamientos diariamente durante la etapa de embriones y los tres estadios larvarios. Se colocaron frascos por triplicado de las especies *wild type*, *curly* y *evony* de cada uno de los siguientes grupos:

1. Grupo control
2. DCA Na
3. Ag C
4. Doxorubicina

Se realizaron conteos del número de larvas en su tercer estadio y del número de moscas eclosionadas para determinar el índice de sobrevivencia a cada uno de los tratamientos. Al tiempo que las moscas eclosionaron fueron observadas en un estereoscopio para verificar si existían cambios en el fenotipo de las mismas.

6.13 Análisis estadísticos

Cada experimento fue realizado por triplicado. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) mediante el uso del programa computacional SPSS 15.0 y las pruebas de Tukey y Dunett para discernir si existía diferencia entre los tratamientos, tomándose valores de $p < 0.05$ como significativos y $p < 0.001$ altamente significativos. Los valores mostrados en porcentaje fueron transformados para su análisis mediante la transformación *Arcsen* utilizando la fórmula $p' = \text{Arcsen} \sqrt{p}$ en el programa SPSS 15.0.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la viabilidad en CMSP tratadas con DCA-Na o Ag C

Con el objetivo de evaluar el porcentaje de viabilidad de las células mononucleares, se cultivaron 1×10^6 células en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% durante 72 horas en presencia de los tratamientos descritos anteriormente. Para esta evaluación se utilizó la técnica de MTT.

Las CMSP tratadas con DCA-Na y Ag C mantuvieron un 81% y 82% de viabilidad respectivamente, no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de viabilidad celular en comparación con el control (Fig. 1).

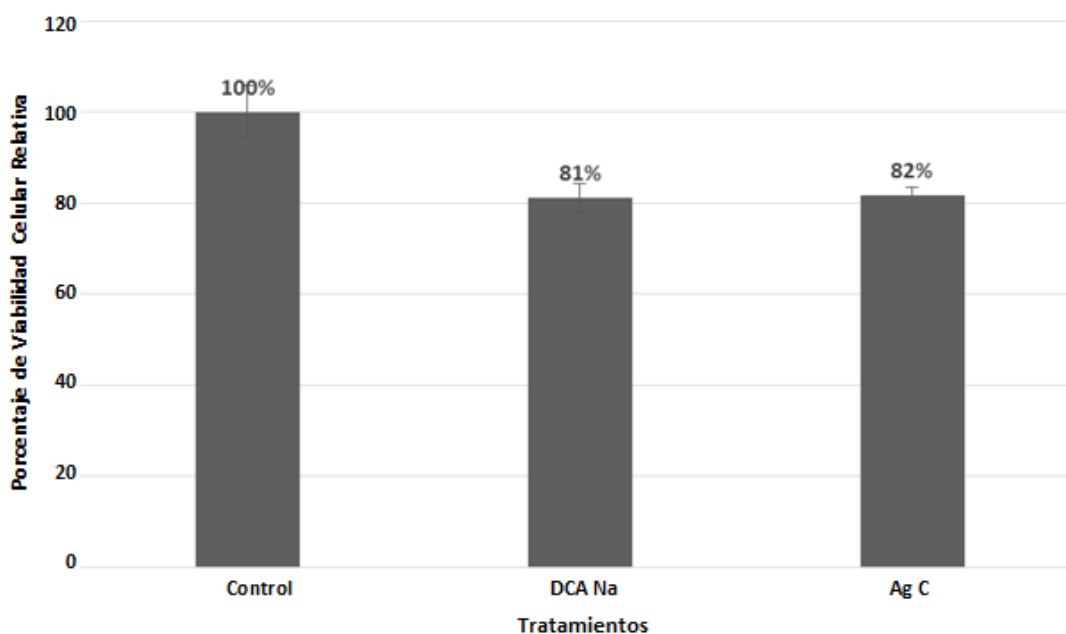


Figura 1. Ensayo de viabilidad celular en CMSP por la técnica de MTT. Se sembraron 1×10^6 células en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, dejándolas incubar durante la noche a una temperatura de 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente se les adicionaron los tratamientos DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL). Pasadas 72h se adicionó el reactivo MTT (5mg/mL) a cada uno de los pozos. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (** $p < 0.001$), (* $p < 0.05$).

7.2 Evaluación de la producción de las citocinas TH1, TH2 y TH17 en CMPS tratadas con DCA-Na o Ag C

Para esta evaluación se colectaron los sobrenadantes del cultivo de las células mononucleares expuestas a los tratamientos ya descritos durante 72h de incubación, se trataron cada una de las muestras como ya se mencionó en la metodología y se adquirieron en el citómetro de flujo, los resultados se muestran en la tabla 2.

Los resultados indicaron un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) del TNF con el tratamiento DCA-Na, así como una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de esta misma citocina en respuesta al tratamiento Ag C. Se empleó como control positivo LPS (100ng/mL) para verificar el correcto funcionamiento del kit utilizado.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF	IFN- γ	IL-17A
Control	0	0	0	0	7.07	0	0
DCA	0	0	0	0	10.77 **	0	0.15
Ag C	0	0	0	0	5.84 **	0	0
LPS	11.69 **	109.31 **	15.14 **	4.18 **	1222.03 **	0	3.17 **

Tabla 2. Producción de citocinas. Se colectó el sobrenadante de los cultivos de CMSP humanas tratadas con DCA Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL) después de un periodo de incubación de 72h, además de un control positivo al que se le adicionó LPS (100ng/mL). Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. Los resultados se muestran en pg/mL (** $p < 0.001$), (* $p < 0.05$).

7.3 Determinación de las poblaciones celulares CD3⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, y CD16⁺CD56⁺ en CMSP tratadas con DCA-Na o Ag C

Para determinar si los tratamientos utilizados afectaban de alguna manera las poblaciones linfocíticas presentes en nuestro cultivo de CMSP, las células fueron expuestas a los tratamientos DCA-Na y Ag C se colectaron a las 72 horas de incubación, y se adquirieron en un citómetro de flujo para analizar los porcentajes de expresión de cada uno de los anticuerpos, los resultados se muestran en las figuras 2, 3, 4, 5, y 6.

Podemos observar los dot plots empleados para seleccionar la población celular a analizar CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en la figura 7; CD16⁺56⁺ y CD3⁺CD19⁺ en la figura 8. Se muestran en las figuras 9 y 10 un esquema representativo de la toma de la población linfoide para su evaluación por citometría de flujo con marcadores específicos.

En los análisis de la población linfoide con el fenotipo CD3⁺ no se observó diferencia significativa en el porcentaje de la población con los tratamientos DCA-Na y Ag C en comparación con el control.

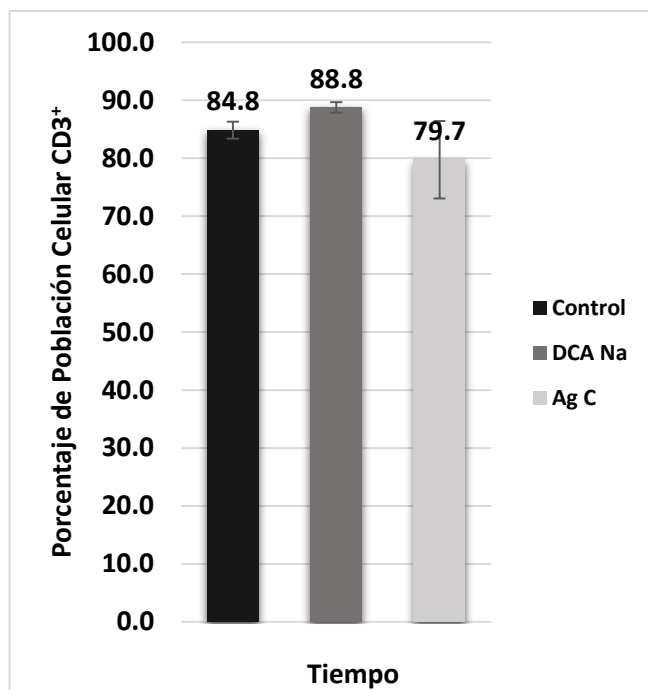


Figura 2. Efecto de los tratamientos de DCA-Na y Ag C sobre la población T CD3⁺. Se sembraron 1 x 10⁶ CMSP en placas de 6 pozos en medio RPMI 1640, fueron tratadas durante 72h con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), posteriormente se evaluó por citometría de flujo el marcador CD3⁺. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (*p < 0.05), (**p < 0.001).

Al evaluar la población celular con fenotipo CD3⁺CD19⁺ a las 24h se encontró que esta disminuye de una manera significativa ($p < 0.05$) con el tratamiento DCA-Na; por el contrario observamos un incremento altamente significativo ($p < 0.001$) en este fenotipo celular con el tratamiento de Ag C en comparación con el control.

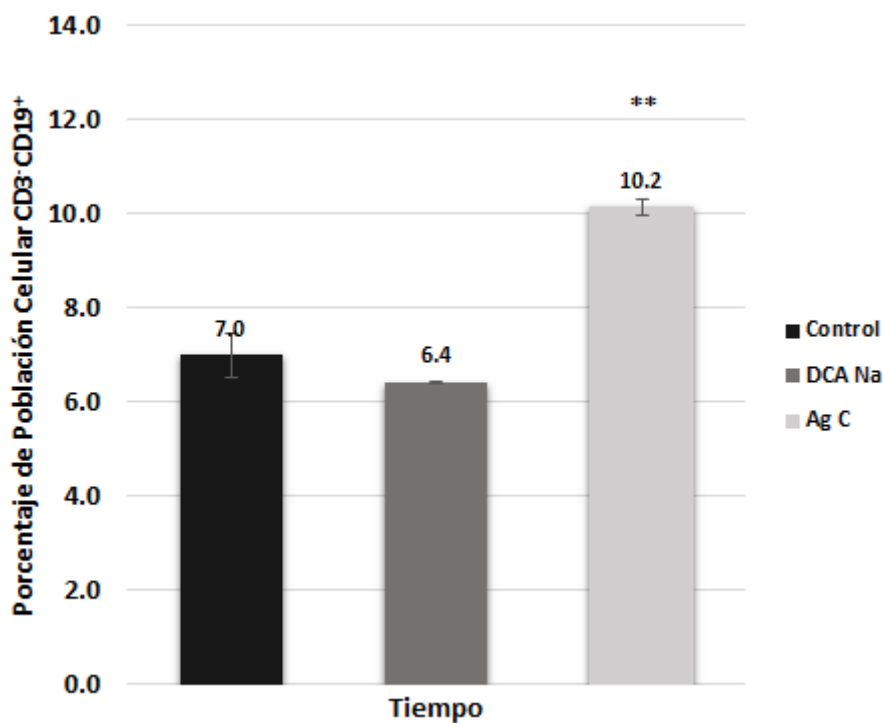


Figura 3. Efecto de los tratamientos de DCA-Na y Ag C sobre la población T CD3⁺CD19⁺. Se sembraron 1×10^6 CMSP en placas de 6 pozos en medio RPMI 1640, fueron tratadas durante 72h con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), posteriormente se evaluó por citometría de flujo el marcador CD3⁺CD19⁺. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (* $p < 0.05$), (** $p < 0.001$).

Los resultados del análisis de la población linfoide con fenotipo CD3⁺CD4⁺ después de 72 horas de incubación, indican que el tratamiento DCA-Na causó un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) de esta población comparado con el control.

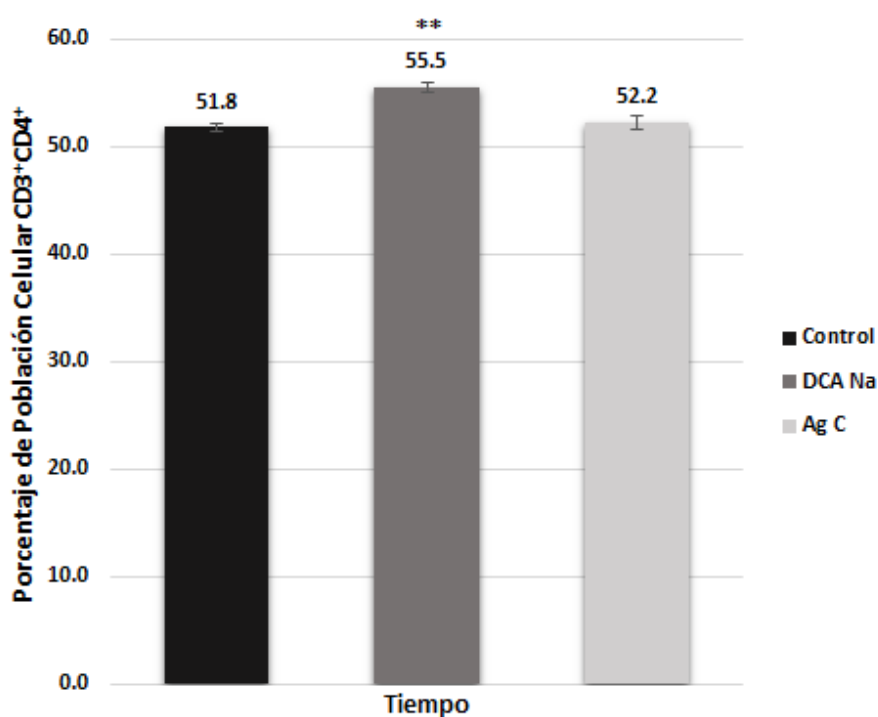


Figura 4. Efecto de los tratamientos de DCA-Na y Ag C sobre las células T CD3⁺CD4⁺. Se sembraron 1×10^6 PBMC en placas de 6 pozos en medio RPMI 1640, fueron tratadas durante 72h con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), posteriormente se evaluó por citometría de flujo el marcador CD3⁺CD4⁺. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (* $p < 0.05$), (** $p < 0.001$).

Se realizó la evaluación de la población celular $CD3^+CD8^+$ encontrando un aumento significativo ($p < 0.05$) de esta población con ambos tratamientos.

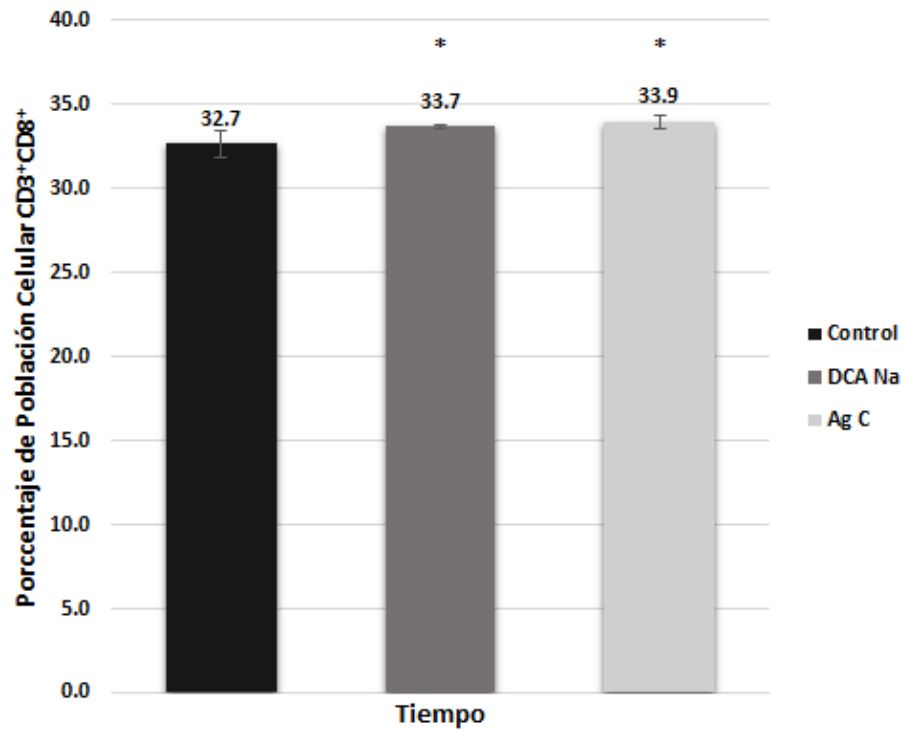


Figura 5. Efecto de los tratamientos de DCA-Na y Ag C sobre las células T $CD3^+CD8^+$. Se sembraron 1×10^6 CMSP en placas de 6 pozos en medio RPMI 1640, fueron tratadas durante 72h con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), posteriormente se evaluó por citometría de flujo el marcador $CD3^+CD8^+$. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (* $p < 0.05$), (** $p < 0.001$).

Los resultados de la evaluación de la población linfoide con fenotipo CD16⁺CD56⁺, después de 72 horas se observó un aumento altamente significativo ($p < 0.001$) de la población causado por los tratamientos DCA-Na y Ag C en comparación con el control.

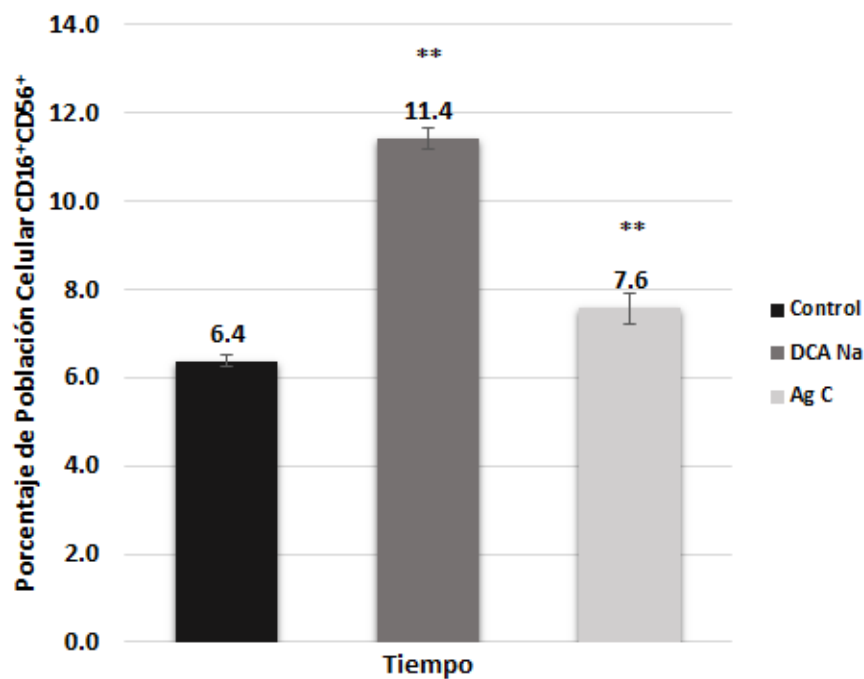


Figura 6. Efecto de los tratamientos de DCA-Na y Ag C sobre las células T CD16⁺CD56⁺. Se sembraron 1×10^6 CMSP en placas de 6 pozos en medio RPMI 1640, fueron tratadas durante 72h con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), posteriormente se evaluó por citometría de flujo el marcador CD16⁺CD56⁺. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (* $p < 0.05$), (** $p < 0.001$).

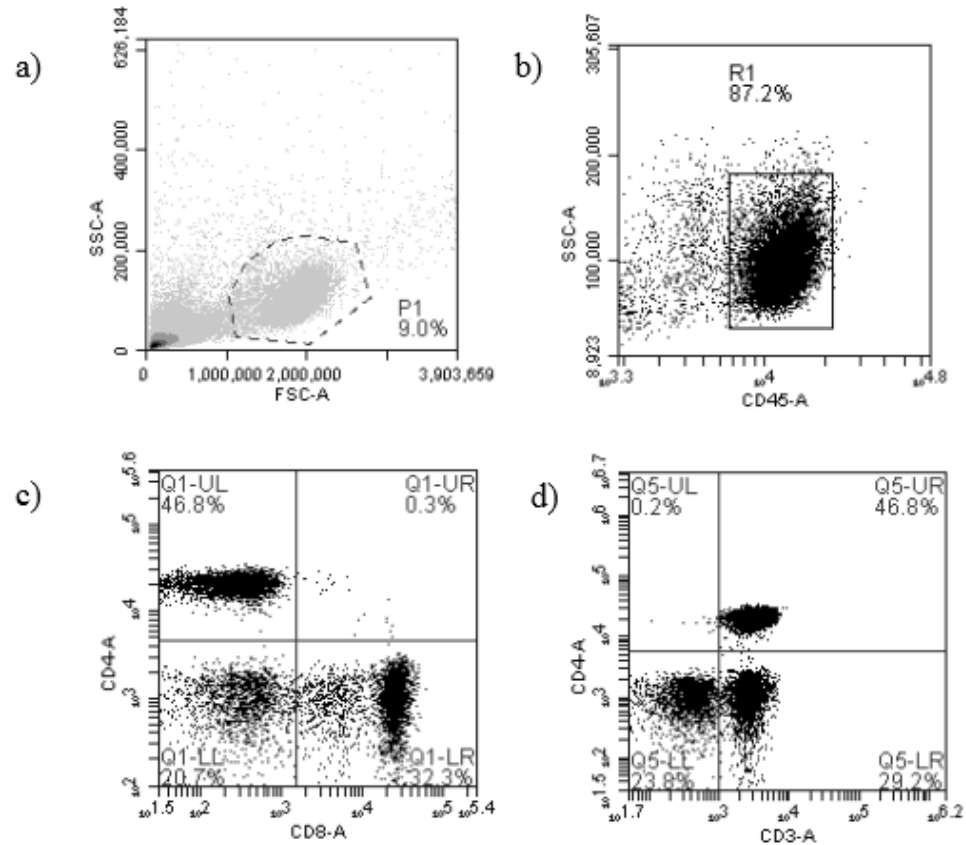


Figura 7. Determinación de poblaciones celulares $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$. 1×10^6 células (CMSP) fueron sembradas en placas de doce pozos con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, las cuales fueron tratadas con DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL). Pasadas 72h las células fueron teñidas con un cocktail de anticuerpos CD3/CD8/CD45/CD4 (BD Multitest). Se muestra el dot plot de FSC/SSC en el cual observamos el tamaño y granularidad de las células y en el cual se realizó el gate para seleccionar la población a analizar (a), posteriormente se realiza otro gate de los linfocitos positivos para CD45 (b), además se muestra el dot plot para determinar el porcentaje de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ (c) y también el de $CD4^+$ y $CD3^+$ (d). Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD.

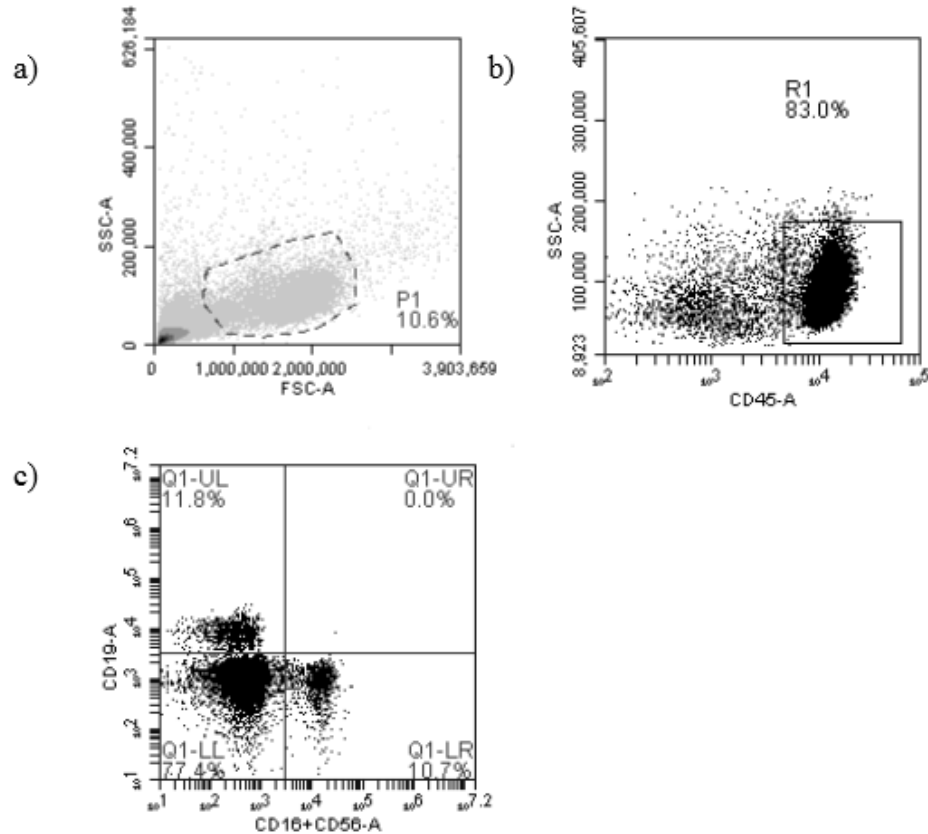


Figura 8. Determinación de poblaciones celulares $CD19^+$ y $CD16^+CD56^+$. 1×10^6 células (PBMC) fueron sembradas en placas de doce pozos con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, las cuales fueron tratadas con DCA Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL). Pasadas 72h las células fueron teñidas con un cocktail de anticuerpos CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 (BD Multitest). Se muestra el dot plot de FSC/SSC en el cual observamos el tamaño y granularidad de las células y en el cual se realizó el gate para seleccionar la población a analizar (a), posteriormente se realiza otro gate de los linfocitos positivos para CD45 (b), además se muestra el dot plot para determinar el porcentaje de linfocitos $CD19^+$ y $CD16^+CD56^+$ (c). Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD.

7.4 Determinación de la actividad fagocítica en macrófagos tratados con DCA-Na o Ag C

Como ensayo preliminar al de fagocitosis, decidimos evaluar la viabilidad de los macrófagos murinos con la técnica de yoduro de propidio, las células fueron sometidas a tres dosis de dicloroacetato de sodio o plata coloidal, con las dosis que se muestran a continuación las cuales están reportadas por nuestro grupo de investigación como dosis letal de 50% en la línea B16F10 (Franco Molina *et.al.* 2012; Sierra Rivera *et.al.* 2013).

1. Grupo Control
2. DCA Na DL₅₀, 300 mM/mL
3. Ag C DL₅₀, 10.5 ng/mL

Al ser evaluada la viabilidad celular mediante la técnica de yoduro de propidio se encontró que los diferentes tratamientos mencionados anteriormente a diferentes dosis y tiempo evaluados no afectan ($p < 0.05$) la viabilidad celular de macrófagos peritoneales murinos como se puede observar en la figura 9.

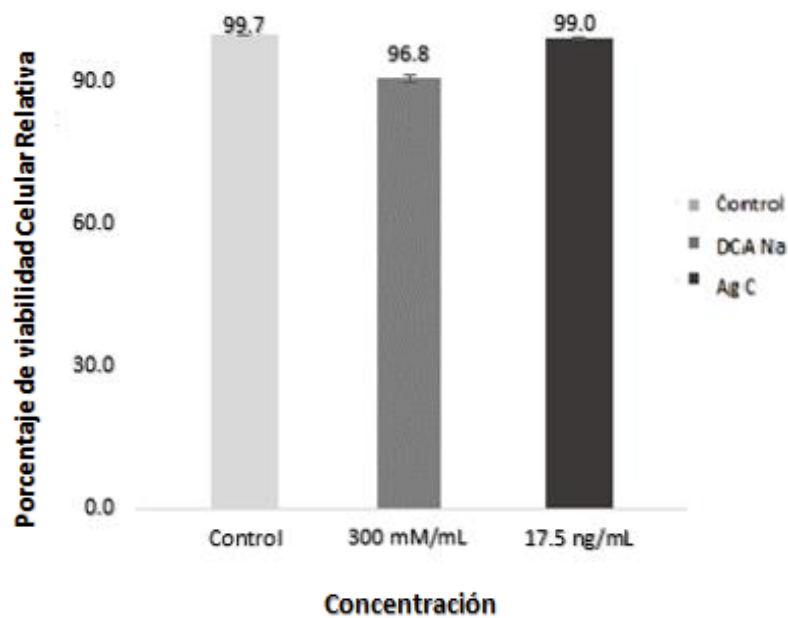


Figura 9. Ensayo de viabilidad celular en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C con la técnica de yoduro de propidio. Se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pozos adicionándoles los tratamientos DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL), las células fueron incubadas durante 72h. Posteriormente, fueron colectadas para ser teñidas con yoduro de propidio y analizar las muestras en un citómetro de flujo Accuri C6 BD. (**p < 0.001), (*p<0.05).

Para la prueba de fagocitosis, las células fueron obtenidas como se describió anteriormente y colectadas para agregarles FITC-Dextran a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ solubilizado en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se muestran los resultados en la figura 10 en el caso del tratamiento con DCA-Na se presentó un incremento altamente significativo ($p < 0.001$) en el porcentaje de fagocitosis de un 23.5% y en el tratamiento Ag C de un 20.17% con respecto a un 4.87% que se presentó en el control.

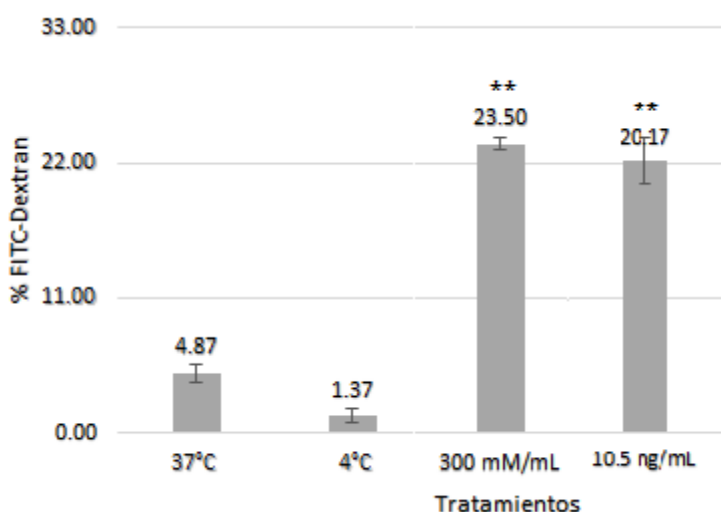


Figura 10. Ensayo de fagocitosis mediante FITC-Dextran en macrófagos murinos. Se sembraron 1×10^6 macrófagos en placas de 6 pozos, se incubaron durante toda la noche y posteriormente se aplicaron los tratamientos DCA-Na (300mM/mL) o Ag C (10.5ng/mL) durante 72h. Para la determinación de la fagocitosis de los macrófagos se adicionó el FITC-Dextran (20 $\mu\text{g/mL}$) y se dejó incubar durante 1h. Se utilizó el citómetro de flujo Accuri C6 BD. (** $p < 0.001$), (* $p < 0.05$).

Para determinar la cantidad de peroxinitritos las cuales están relacionadas de manera indirecta con la producción de óxido nítrico, se determinó en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos murinos. Se encontró que pasadas 72 horas de incubación se registró una disminución significativa ($p < 0.05$) de la concentración de nitrato con el tratamiento DCA Na 300mM/mL, por otra parte no se afectó esta producción de nitrato con el tratamiento Ag C en comparación con el control.

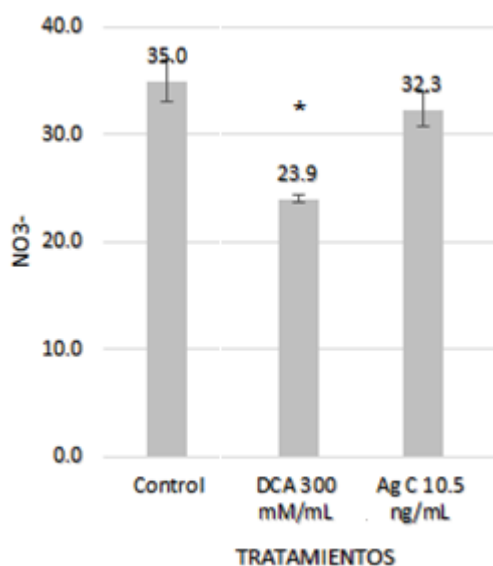


Figura 11. Ensayo de óxido nítrico en macrófagos murinos tratados con DCA-Na o Ag C. Se sembraron 1×10^6 células en placas de seis pozos en presencia de DCA Na (300mM/mL), Ag C (10.5ng/mL). Pasadas 72h de incubación se colectó el sobrenadante del cultivo para posteriormente realizar el ensayo de óxido nítrico y evaluar los niveles de nitrato presentes (** $p < 0.001$), (* $p < 0.05$).

7.5 Análisis de mutagenicidad de los tratamientos DCA-Na o Ag C

Se evaluó los posibles efectos toxicológicos y genotóxicos en los diferentes estadios del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*, adicionando los tratamientos a la comida de las moscas, posteriormente se monitoreó la morfología después de la exposición con los tratamientos para evaluar su efecto teratógeno o citotóxico.

Se muestran los resultados en la figura 12 del número de larvas y en la figura 13 del número de moscas, de tres especies de *Drosophila melanogaster*, *wild type*, *ebony* y *curly*, los cuales indican que hubo una disminución altamente significativa ($p < 0.001$) de la viabilidad de las larvas y a causa de esto, se detectó eclosión de un número reducido de moscas en la especie *ebony* tratada con doxorubicina comparado con su control, no se observó diferencia significativa con los diferentes tratamientos en las otras especies.

En la figura 14 podemos observar la morfología de las moscas de la especie *wild type*, expuestas a los diferentes tratamientos, en las cuáles no se detectaron cambios fenotípicos, adicionalmente en la figura 15 podemos ver igualmente que no se detectaron cambios morfológicos en la especie *ebony*, sin embargo en el inciso c) de esta misma figura se aprecia un reducido número en las moscas que fueron tratadas con doxorubicina.

Por otra parte se observó que la especie *curly*, tratada con doxorubicina sufrieron una alteración en las alas las cuales no mostraban la curvatura característica de las alas, observando un cambio fenotípico de alas planas en un 3% de las moscas eclosionadas (Fig. 16).

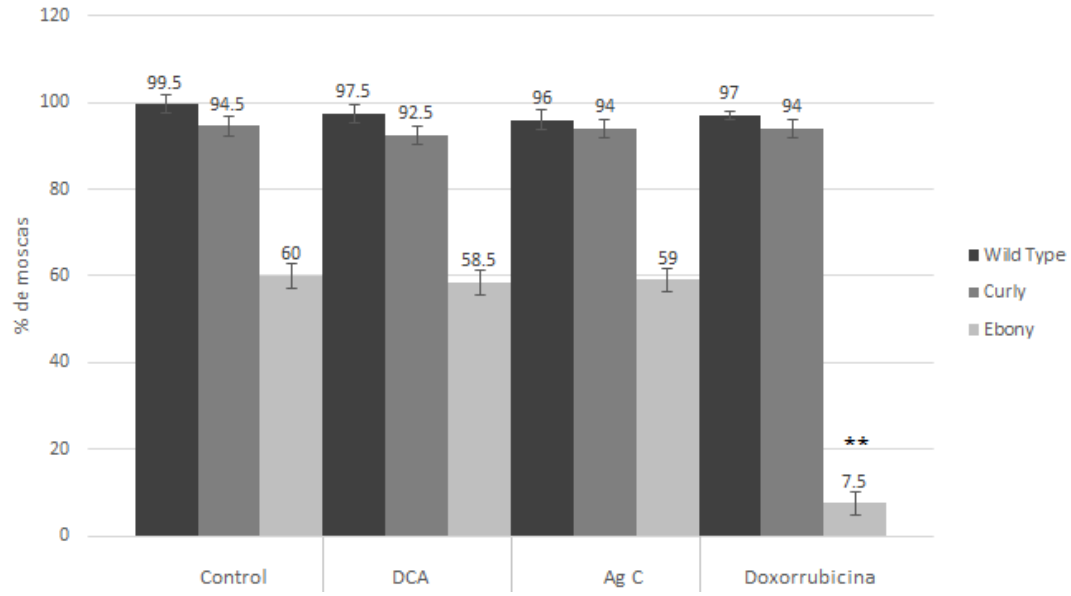


Figura 12. Viabilidad de moscas eclosionadas sometidas a diferentes tratamientos. Diferentes especies de *D. melanogaster* fueron tratadas con DCA-Na, Ag C y doxorubicina, observamos en la gráfica el número de moscas pasadas 24h de su eclosión.

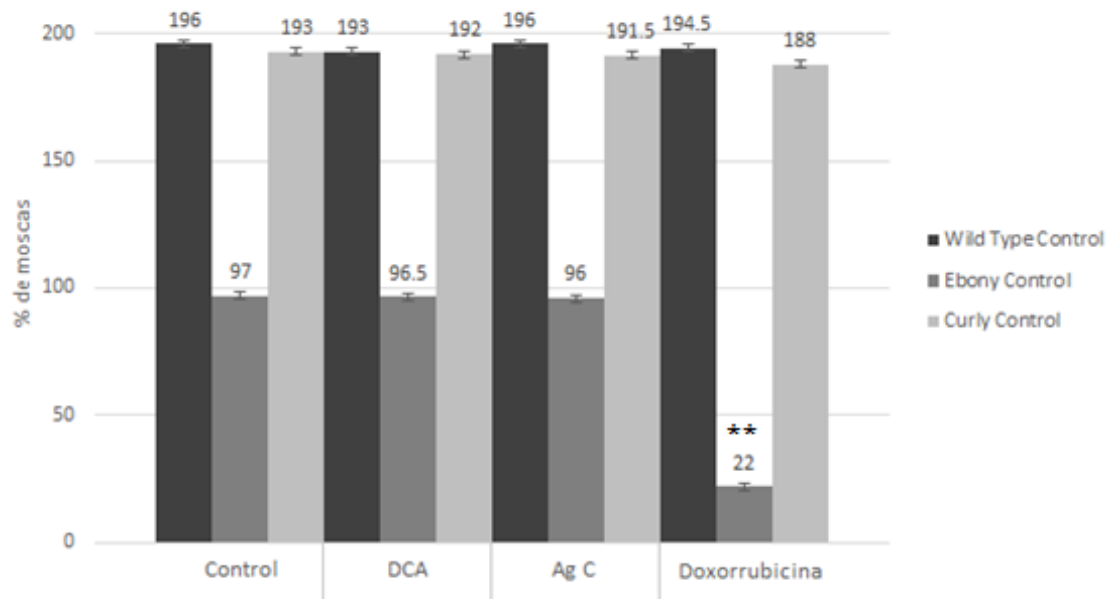


Figura 13. Viabilidad de larvas de *D. melanogaster* sometidas a diferentes tratamientos. Diferentes especies de *D. melanogaster* fueron tratadas con DCA-Na, Ag C y doxorubicina, observamos en la gráfica el número de larvas en tercer estadio.



Figura 14. Evaluación de la morfología de *D. melanogaster* wild type. En la figura se muestran los diferentes grupos evaluados en el estudio, a) grupo control, b) grupo tratado con DCA-Na, c) grupo tratado con Ag C y d) grupo tratado con Doxorubicina.

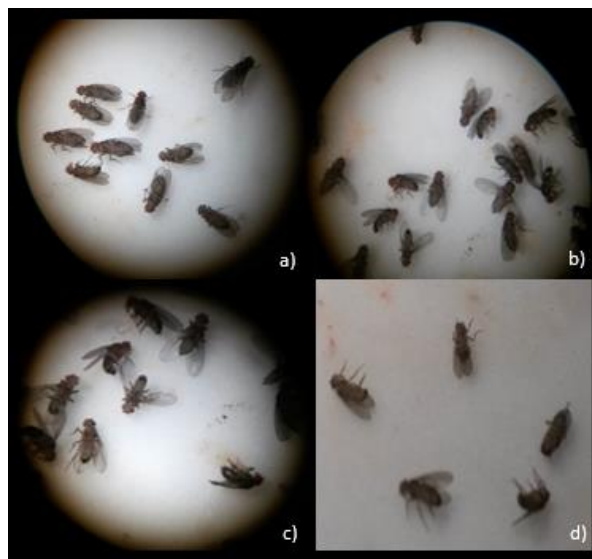


Figura 15. Evaluación de la morfología de *D. melanogaster* ebony. En la figura se muestran los diferentes grupos evaluados en el estudio, a) grupo control, b) grupo tratado con DCA-Na, c) grupo tratado con Ag C y d) grupo tratado con Doxorubicina.

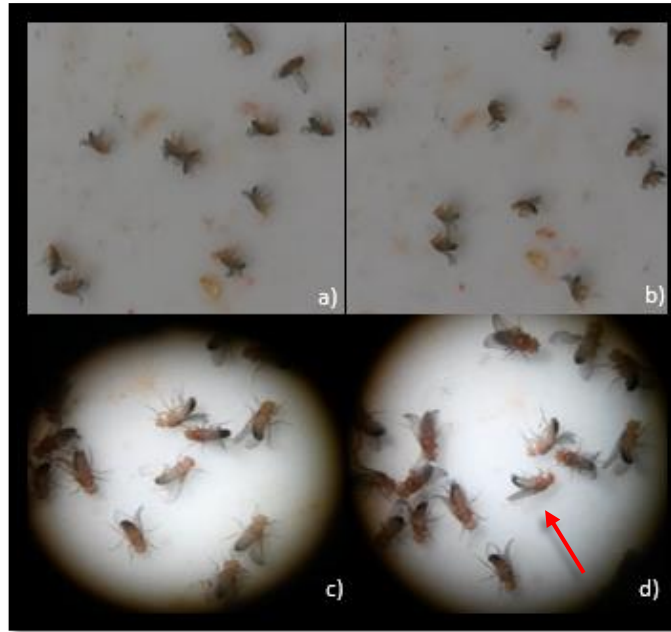


Figura 16. Evaluación de la morfología de *D. melanogaster curly*. En la figura se muestran los diferentes grupos evaluados en el estudio, a) grupo control, b) grupo tratado con DCA, c) grupo tratado con Ag C y d) grupo tratado con Doxorubicina, en este se resalta con una flecha roja, una de las moscas en la que observamos cambio en el fenotipo de las alas de curvas a lisas.

Los resultados obtenidos muestran el índice de sobrevivencia (IS) como el indicador para evidenciar el daño causado en este caso por el tratamiento Doxorubicina en la especie *ebony*, donde se registró una disminución altamente significativa del índice de sobrevivencia de las larvas y moscas de esta especie (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Índice de sobrevivencia en larvas

	<i>Wild</i>	<i>Ebony</i>	<i>Curly</i>
<i>Type</i>			
Control	1	1	1
DCA	0.984	0.994	0.994
Ag C	1	0.989	0.992
Doxorrubicina	0.992	0.226 **	0.974

Tabla 4. Índice de sobrevivencia en las moscas

	<i>Wild</i>	<i>Ebony</i>	<i>Curly</i>
<i>Type</i>			
Control	1	1	1
DCA	0.979	0.975	0.975
Ag C	0.964	0.983	0.994
Doxorrubicina	0.974	0.125 **	0.994

8. DISCUSIÓN

El sistema inmune consta de células y moléculas, las cuáles ante la entrada de un agente extraño desencadenan una respuesta conjunta y coordinada con el objetivo de mantener la homeostasis en nuestro organismo; un desbalance en este sistema originado por tratamientos dirigidos a combatir ciertas enfermedades puede comprometer la salud del individuo. Un ejemplo de esto son las drogas quimioterapéuticas empleadas en el tratamiento del cáncer en donde se puede observar que la citotoxicidad sobre las células del cáncer no es exclusiva de éstas con el tratamiento de cisplatino sino que también se ven afectadas las células de médula ósea y del sistema inmunológico (Büsserlberg 2011). Debido a esto un aspecto importante a considerar en la búsqueda de tratamientos nuevos y mejores para erradicar el cáncer, es que las nuevas alternativas de tratamientos afecten en la menor medida posible los tejidos sanos adyacentes, así como minimizar los efectos secundarios de los mismos, además de que no causen una disfunción en las células del sistema inmune y sus mecanismos de acción en la defensa del huésped.

Nuestros resultados demuestran que el DCA-Na y la plata coloidal no afectan de manera significativa el porcentaje de viabilidad de las CMSP y de macrófagos peritoneales murinos. Estos datos difieren de los encontrados por Plate, 2004 en donde el tratamiento con gemcitabina induce daño a nivel periférico en los niveles de linfocitos demostrando que este tratamiento es citotóxico sobre células del sistema inmunológico. Otro estudio demuestra que el tratamiento quimioterapéutico con ciclofosfamida causó una disminución de las células linfoides, incluyendo linfopenia y una reducción significativa en el número de macrófagos encontrados en exudados peritoneales (Winkelstein, 1973).

Otro resultado interesante en nuestro estudio es que los tratamientos con DCA-Na y Ag C tienen la capacidad de incrementar la fagocitosis en macrófagos peritoneales murinos. Se han desarrollado varias estrategias empleadas en el tratamiento del cáncer enfocadas en compuestos que tengan la capacidad de inducir en las células presentadoras de antígeno la presentación de antígenos asociados al tumor para una mejor respuesta en el tratamiento de esta enfermedad. Tal es el caso del tratamiento en pacientes con cáncer de la toxina de Coley la cuál ejerce su efecto procesando y presentando antígenos asociados al tumor mediante las células presentadoras de antígeno del huésped a las células T para que se active el reconocimiento inmunológico a través de una respuesta de células T específicas

de tumor para su eliminación. El GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos) así como el BCG (Bacilo de Calmete Geri) son compuestos empleados con la finalidad de inducir una presentación de antígeno y generar una respuesta en contra del tumor (Schuster et al. 2006). Aunque no se han encontrado referencias en la literatura respecto a esta capacidad del DCA-Na y Ag C podemos sugerir que la administración de estos compuestos pudiese inducir citotoxicidad sobre las células tumorales y actividad adyuvante.

Adicionalmente se realizaron estudios para evaluar la concentración de nitratos presentes en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, los resultados indicaron que el tratamiento DCA-Na no afectó la producción de nitritos y que el tratamiento con Ag C provocó una disminución significativa de éstos. Estudios sugieren que las especies reactivas de oxígeno derivadas del óxido nítrico pueden tener efectos carcinogénicos ya sea alterando directamente el DNA así como potenciando la genotoxicidad de otras sustancias como agentes alquilantes y metales como el cadmio (Wink *et al.* 1998). Sabemos de antemano que la plata se encuentra en el grupo de los metales, estos resultados pueden sugerir que el tratamiento de plata coloidal puede presentar actividad adyuvante al contrarestar la producción de moléculas tóxicas presentes en el microambiente tumoral. Adicionalmente, debido a su propiedad de disminución de peroxinitritos, se sugieren realizar estudios en donde se compruebe su actividad antiinflamatoria.

Además de esto determinamos que el DCA-Na y Ag C no inducen mutagenicidad sobre el desarrollo de distintas mutaciones de *Drosophila melanogaster* (*wild type* (+), *ebony* (*e*), *curly* (*Cy*)), como lo indujo el tratamiento con doxorubicina la cual generó alta mortalidad en las larvas *ebony* y cambios en el fenotipo *curly*. Esto concuerda con otros estudios en donde se encontró que el DCA-Na no induce mutaciones determinado por la prueba de Ames, prueba de aberraciones cromosómicas en ovario de ratas y un ensayo de micronúcleos (Fox et al., 1996). Estudios de mutagenicidad en plata coloidal son poco conocidos pero el uso rutinario de este compuesto como desinfectante de alimentos y agua en humanos pudiese sugerir su baja o nula genotoxicidad. Sin embargo estudios con nanopartículas de plata demuestran su capacidad citotóxica, genotóxica y antiproliferativa; como regla general agentes que dañan al ADN tienen el potencial de

causar inestabilidad genómica el cuál es un factor predisponente en carcinogénesis (AshaRani et al., 2009), estos datos son opuestos a los encontrados con la plata coloidal.

Por otra parte se determinó que el tratamiento Ag C aumentó las poblaciones linfocíticas $CD3^+CD19^+$, $CD3^+CD8^+$ y $CD16^+CD56^+$ igualmente en el caso del tratamiento DCA-Na exceptuando la subpoblación $CD3^+CD19^+$ en la cual causó una disminución de su porcentaje y un aumento en la población $CD3^+CD4^+$, esta última población no presentó cambios con el tratamiento Ag C.

Los pacientes que han sido sometidos a tratamientos de quimioterapia o radioterapia a causa del cáncer presentan alguna anormalidad en el funcionamiento de su sistema inmunológico (Dillman et al, 1984). En un estudio realizado en pacientes sometidos a ciclos de quimioterapia en el que incluyeron fármacos como vincristina, ciclofosfamida y doxorubicina se observó una disminución en el conteo de los linfocitos B, T $CD4^+$ y $CD8^+$, considerando los antecedentes de infecciones oportunistas en pacientes con otras patologías en las cuales también existe disminución de las poblaciones linfocíticas, en los pacientes con cáncer podría presentarse una inmunocompetencia debido a las altas dosis de los quimioterapéuticos empleados para su tratamiento (Mackall *et al.* 1994). Nuestros resultados sugieren que ambos tratamientos pueden ser administrados sin causar daño en los diferentes subtipos de linfocitos, además de que el hecho que aumenten la población de linfocitos T $CD8^+$, nos indica que esta propiedad de nuestros tratamientos puede ser utilizada en conjunto con inmunoterapias en las cuales se empleen linfocitos T citotóxicos específicos de tumor.

Por otra parte se sabe la importancia de las células T $CD4^+$ en la inmunidad antitumoral, ya que son capaces de inducir las respuestas específicas de tumor y que son indispensables para la generación y mantenimiento de las células T $CD8^+$, aunado a esto las células T $CD4^+$ pueden mediar el rechazo tumoral a través de los efectos citotóxicos de los linfocitos $CD8^+$ eliminando las células tumorales, la regulación positiva de la expresión de moléculas MHC, capacidad de antiangiogenesis y la inducción de dormancia en el tumor; en nuestro trabajo determinamos la capacidad del DCA de aumentar esta subpoblación linfocítica, la cual como sabemos será de suma importancia en la erradicación de tumores, por el contrario el tratamiento Ag C no causó ningún cambio en esta población celular.

Se ha demostrado anteriormente la capacidad de las células NK de eliminar células tumorales presentes en la circulación de ratones y ratas a las que cuales se les indujeron tumores, también que las funciones de las células NK tienen importancia en el control de metástasis y que en pacientes con metástasis avanzadas por lo regular se presentan anormalidades en la función y número de las células NK (Whiteside y Herberman 1995), en nuestro trabajo observamos que tanto el dicloroacetato de sodio y la plata coloidal poseen la capacidad de aumentar dicha población linfocítica, dato importante en su utilización como agentes antitumorales.

La mayoría de los pacientes con tumores sólidos son portadores de anticuerpos antitumorales y muchos de estos tumores contienen una población de células B infiltrantes la cual implica una asociación entre eventos oncogénicos y activación de células B (Spaner y Bahlo 2011). La inmunidad mediada por células B puede ser benéfica ya que proporciona protección mediada por anticuerpos con una probable activación del sistema de complemento para la eliminación del tumor. El encontrar una población de células B que incrementa con nuestro tratamiento Ag C es importante debido a la función de estas células en el sistema inmune y protección en contra del tumor.

Por otra parte los linfomas de células B, se desarrollan debido a una transformación maligna de las células B de los centros germinales o post-germinales, presentando un incremento descontrolado de estas células malignas (Kuppers *et al.* 1999) sorprendentemente estos linfomas se presentan con muchas variantes tanto clínicas como histopatológicas, esto debe ser considerado ampliamente al decidir el tratamiento que se administrará en este tipo de linfomas, en nuestro trabajo se observó la capacidad que posee el DCA-Na de disminuir el porcentaje de células CD19⁺, esta propiedad nos sugiere el uso de este tratamiento en los linfomas de células B en combinación con regímenes de quimioterapia tradicional.

En cuanto al aumento de producción de TNF dada por el DCA-Na y la disminución de esta misma citocina dada por el tratamiento Ag C es de importancia considerar que se ha probado que el TNF tiene actividad antitumoral directa al matar algunas células cancerosas y reducir su tasa de proliferación sin afectar las células normales. Se ha

demostrado además que el TNF inhibe la angiogénesis al dañar las células endoteliales de los vasos sanguíneos situados en la contigüidad del tumor, con lo que disminuye el flujo de sangre y oxígeno indispensable para el crecimiento tumoral progresivo (Roitt y Delves 2001).

Anteriormente se ha estudiado el efecto inmunomodulador del DCA-Na, a través de la vía de activación IL-12–IFN- γ encontrando que es capaz de modular citocinas a través de linfocitos Th1 (Badr *et al.* 2014). El trabajo de Ohashi en el 2013 demostró también un efecto inmunomodulador de este tratamiento el cuál incrementó el número de células T CD8⁺ y de células NK productoras de INF- γ . No existen reportes acerca de que la plata coloidal tenga el mismo efecto, sin embargo estudios comprueban el efecto de las nanopartículas de plata en la secreción de IL-6 dada por macrófagos Raw 264.7 (Klippstein *et al.*, 2008), así como otras investigaciones que indican la expresión de algunas citocinas en CMSP (Shin *et al.*, 2007), células madre mesenquimales (Greulich *et al.*, 2009) y en macrófagos J771 A1 (Yen *et al.*, 2009).

El primer trabajo en el cuál se reportó el potencial antitumoral del dicloroacetato de sodio fue reportado por el grupo de trabajo de Bonnet en 2007 en el cual se encontró una disminución del potencial de membrana mitocondrial y una reducción en la resistencia a la apoptosis en diversas líneas de cáncer (A549, MCF7, and M059K), además se ha demostrado su efecto citotóxico en diversas líneas de cáncer colorectal (Madhok *et al.*, 2010) y de endometrio (Wong *et al.*, 2008). En 2012 nuestro equipo de investigación utilizó el DCA-Na como tratamiento en las líneas de cáncer B16F10, MCF-7, INER-51, MDA-MB 231, Huh-7, Hela, TC-1, PC3 y DU145, encontrando un efecto citotóxico en todas las líneas, siendo más sensible la línea B16F10 se determinaron las concentraciones tóxicas las cuales fueron DL₂₀ (75 Mm/mL), DL₅₀ (300 Mm/mL), y DL₉₀ (750 Mm/mL) a las 24, 48 y 72 horas de tratamiento, la dosis letal media fue empleada en el presente trabajo para evaluar distintos parámetros inmunológicos *in vitro*.

Por otra parte la plata coloidal fue utilizada en el tratamiento de numerosas enfermedades antes del surgimiento de los antibióticos, y su uso se retomó debido a la resistencia bacteriana desarrollada hacia muchos antibióticos (Landsow, 2010). Los principales reportes de los usos de la plata coloidal son acerca de su actividad antimicrobiana, sin

embargo existen escasos reportes de su actividad antitumoral, nuestro equipo de trabajo reportó el efecto citotóxico de este tratamiento sobre la línea celular de cáncer MCF-7 (Franco Molina *et al.* 2010) y sobre la línea B16F10 (Sierra Rivera *et al.* 2013) encontrando una DL_{50} con la dosis de 10.5ng/mL a las 24h, además de que el tratamiento fue aplicado en ratones C57BL/6 a los cuales se les inoculó con células B16F10 encontrando una reducción significativa ($p<0.05$) del tamaño y volumen de los tumores, así como una disminución en la metástasis hacia otros órganos.

En el presente trabajo nuestros resultados indican que el empleo del DCA-Na y Ag C, no tienen efectos mutagénicos, y que poseen la capacidad de inducir efectos sobre las células del sistema inmune evaluadas, este último resultado no se ha reportado en la literatura actual.

9. CONCLUSIONES

- El dicloroacetato de sodio o la plata coloidal en una dosis de 300 Mm/mL y 10.5 ng/mL respectivamente no afectan la viabilidad de las células mononucleares de sangre periférica *in vitro*.
- El dicloroacetato de sodio incrementa la producción de TNF 3.7 pg/mL y la plata coloidal la disminuye 1.23 pg/mL.
- El dicloroacetato de sodio no afecta la población linfocítica con fenotipo CD3⁺, disminuye la subpoblación CD3⁺CD19⁺ 0.6% y aumenta las poblaciones linfocíticas CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y CD16⁺CD56⁺ en 3.7%, 1% y 5% respectivamente.
- La plata coloidal no afecta las poblaciones linfocíticas con fenotipo CD3⁺ y CD3⁺CD4⁺ y aumenta las poblaciones CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD8⁺ y CD16⁺CD56⁺ en 3.2%, 1.2% y 1.2% respectivamente.
- El dicloroacetato de sodio o la plata coloidal no afectan la viabilidad de los macrófagos peritoneales murinos *in vitro*.
- El dicloroacetato de sodio o la plata coloidal incrementan la capacidad de fagocitosis de los macrófagos peritoneales murinos *in vitro* en un 18.63% y 15.3% respectivamente.
- El dicloroacetato de sodio o la plata coloidal no causan daños en el fenotipo o ciclo de vida de las moscas *Drosophila melanogaster*, *curly* y *ebony*.

10.PERSPECTIVAS

- Nuestros resultados dan la pauta para estudios futuros acerca de los efectos del dicloroacetato de sodio y la plata coloidal en el sistema inmunológico en modelos *in vivo*.
- Se puede investigar acerca de otras aplicaciones del dicloroacetato de sodio y la plata coloidal por ejemplo en potenciar la respuesta inmune valiéndonos de la capacidad que poseen ambos de aumentar la capacidad de fagocitosis y de incrementar el porcentaje de algunas subpoblaciones linfoides.

11. LITERATURA CITADA

Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. 2012. Cells and tissues of the immune system. In: Cellular and Molecular Immunology. El Sevier: Philadelphia, pp. 15-35.

AshaRani P, Hande M and Valiyaveetil S. 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. BMC Cell Biology. Vol. 10: 65 1-14.

AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande M, and Valiyaveetil S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver. Nanoparticles in Human Cells. ACS Nano. Vol. 3: 279–290.

AshaRani P, Sethu S, Kheng H, Balaji G, Valiyaveetil S and Hande M. 2012. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. Genome Integrity Vol. 3: 1-14.

Badr M, Qinna N, Qadan F, and Matalka K. 2014. Dichloroacetate modulates cytokines toward T helper 1 function via induction of the interleukin-12–interferon- γ pathway. OncoTargets and Therapy. Vol:7 193–201.

Barton B. 1996. The Biological Effects of Interleukin 6. Medicinal Research Reviews, 16:87-109.

Bogdan C, Rölinghoff M and Diefenbach A. 2000. The role of nitric oxide in innate Immunity. Immunological Reviews. Vol. 173: 17–26.

Bradley J. 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*. 214: 149–160

Carmona Ortiz Enricco R. 2009. Tesis Doctoral. Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos *SMART* de alas y *COMETA*.

Choi P, Reiser H. 1998. IL-4: role in disease and regulation of production. *Clinical Experiments Immunology*. 317-319.

Couper K, Blount D and Riley E. 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *Journal of Immunology*. Vol. 180:5771-5777.

Cua D and Tato C. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. 10: 479-487.

Diehl S, Rincón M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* 39: 531–536.

Dillman R, Koziol JA, Zavanelli MI, Beauregard JC, Halliburton B, Glassy M, and Royston I. 1984. Immuno incompetence in Cancer Patients Assessment by In Vitro Stimulation Tests and Quantification of Lymphocyte Subpopulations. *Cancer* Vol. 53: 1484- 1491.

Fox A, Yang X, Murli H, Lawlor T, Cifone M and Reno F. 1996. Absence of Mutagenic Effects of Sodium Dichloroacetate. *Fundamental and Applied Toxicology*. Vol. 32: 87-95.

Franco Molina MA, Mendoza Gamboa E, Sierra Rivera CA, Gómez Flores RA, Zapata Benavides P, Castillo Tello P, Alcocer González JM, Miranda Hernández DF, Tamez Guerra R y Rodríguez Padilla C. 2010. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29:148.

Franco Molina MA, Mendoza Gamboa E, Sierra Rivera CA, Zapata Benavides P, Miranda Hernández DF, Chávez Reyes A, Rivera Morales LG, Tamez Guerra R y Rodríguez Padilla C. 2012. In vitro and in vivo antitumoral activity of sodium dichloroacetate (DCA-Na) against murine melanoma. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6, 4782-4796.

Geneser F. 1999. *Histología*. Editorial Panamericana. pp. 103-120.

Goenaga J. 2010. Resistencia a la inanición en *Drosophila melanogaster*: variación genética natural y su relación con la longevidad y las reservas energéticas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Green K, Rowbottom D and Mackinnon L. 2002. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 92: 2390-2395.

Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler G, Schildhauer T, Eppleb M and Köller M. 2011. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. *Acta Biomaterialia* Vol. 7: 3505–3514.

Iwakura Y, Nakae S, Saijo S and Ishigame H. 2008. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological Reviews*. Vol. 226: 57–79.

Klippstein R, Fernandez R, Castillo P, Zaderenko A and Pozo D. Silver nanoparticles interactions with the immune system: implications for health and disease. pp. 309-322 [Online]. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/9728.pdf>

Korn T, Bettelli E, Oukka M, and Kuchroo V. 2009. IL-17 and Th17 Cells Annual Review Immunology. 27:485–517.

Kumar V, Thaddeus G, Lawrencw Y, Liu J and Bennett M. 1997. Role of murine NK cells and their receptors in hybrid resistance. *Current Opinion in Immunology*. 9: 52-56

Küppers R, Klein U, Leohansmann M, and Rajewsky K. 1999. Cellular origin of human b-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 341: 1520-1527.

Lansdown 2006. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Dermatology*. 33: 17-34.

Lansdown Alan B. G. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Advances in Pharmacological Sciences*. 1-13.

Liao W, Lin J and Warren L. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity Review*. 38:13-21.

Mackall C, Fleisher T, Brown M, Magrath I, Shad A, Horowitz M, Wexler L, Adde M, McClure L, and Gress R. 1994. Lymphocyte Depletion During Treatment With Intensive Chemotherapy for Cancer. *Vol. 84: 2221-2228*.

Madhok BM, Yeluri S, Perry SL, Hughes TA and Jayne DG. 2010. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* 102,1746 – 1752.

Mege J, Meghari S, Honstetter A, Capo C, Raoult D. 2006. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infectious Diseases*. 6: 557–569

Michelakis ED, Webster L and Mackey JR. 2008. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer*. 99:989 – 994.

Mosmann T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. Vol. 65: 55-63.

Mosmann T, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cells subsets: Th1, Th2 and more. *Review Immunology Today*. Vol. 17:138-145.

Ohashi T, Akazawa T, Aoki M, Kuze B, Mizuta K, Ito Y and Inoue N. 2013. Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity. *International Journal of Cancer*. Vol. 133: 1107–1119.

Papandreau I., Goliasova T. , and Denko NC. 2011. Anticancer drugs that target metabolism: is dichloroacetate the new paradigm? *International Journal of Cancer* 128, 1001–1008.

Parkin J, Cohen B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777–1789.

Peakman M and Vergani D. 2009. *Basic and Clinical Immunology*. Churchill Livingstone pp. 33-52

Plate J, Plate A, Shott S, Bograd S, Harris J. 2005. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the páncreas. *Cancer Immunology Immunotherapy* Vol. 54: 915–925.

Roitt I, and Delves P. 2008. *Essential Immunology*. Blackwell Publishing. pp. 200-211.

Romagnani S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology Today*. Vol. 18:263-266.

Schuster M, Nechansky A, Loibner H and Kircheis R. 2006. Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*. Vol. 1: 138–147.

Shin S, Ye M, Kim H, and Kang H. International Immunopharmacology. 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. Vol 7: 1813–1818.

Sierra-Rivera C. A., Franco-Molina M. A., Mendoza-Gamboa E., Zapata-Benavides P., TamezGuerra R. S. and Rodríguez-Padilla C. 2013. Potential of colloidal or silver nanoparticles to reduce the growth of B16F10 melanoma tumors. African Journal of Microbiology Research Vol. 7: 2745-2750.

Smyth M and Johnstone A. 2000. Role of TNF in Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. Cellular Cytotoxicity Laboratory. Microscopy Research and Technique. Vol. 50:196 – 208.

Spaner D and Bahlo A. 2011. B Lymphocytes in Cancer Immunology. Experimental and Applied Immunotherapy. pp 37-57.

Stacpoole P, Greene Y. 1992. Dichloroacetate. Diabetes Care. Vol. 15: 785-790.

Stauber D, Debler E, Horton P, Smith K, and Wilson I. 2006. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. PNAS. Vol. 103: 2788 –2793.

Tamez R, Rodríguez C, Tamez P, Weber R, Gómez R y Calderón C. 2001. Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de plantago mayor. Ciencia UANL. Vol. IV: 304-310.

Tracey D, Klareskog L, Sasso E, Salfeld J, Tak P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. Vol. 117:244–279.

Ulmer A, Flad H, Rietschel T and Mattern T. 2000. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). *Toxicology*. Vol. 152: 37–45.

Visser K, Eichten A and Coussens L. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews* 24-35.

Wadhera A and Fung M. 2005. Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatology Online Journal*. Vol. 11: 1-12.

Wang T, Hong J, Sun W, Xu G, Li N, Chen X, Liu A, Xu L, Sun B and Zhang J. Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺CD25[–]T cells to CD4⁺. 2006. *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 116: 2434–2441.

Weiss D and Brown M. 2001. Regulation of IL-4 production in mast cells: a paradigm for cell-type-specific gene expression. *Immunological Reviews*. 179: 35–47

Whiteside T and Herberman R. 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Current Opinion in Immunology*. Vol. 7: 704-710.

Wilkenstein A. 1973. Mechanisms of Immunosuppression: Effects of cylophosphamide on cellular immunity. *Blood Journal*. Vol. 4 : 273-283.

Wink D, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst M and Mitchell J. 1998. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. Vol.19 : 711–721.

Wong J, Huggins G, Debidia M, Munshi N and De Vivo I. 2008. Dichloroacetate Induces Apoptosis in Endometrial Cancer Cells. *Gynecol Oncol*. 109(3): 394–402.

Wolfgang A, Schulte J, Berger D, Roland M, Heinz F. 1995. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs*. Vol 6: 104-110.

Yassin A, Saad Farid, et al. 2008 Testosterone and Erectile Dysfunction *Journal of Andrology*.

Yen H, Hsu S, and Tsai C. 2009. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small*. Vol. 5: 1553-1561.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mariel Iraida Chapa Rico

Candidato para el grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA
HUMANA AL TRATAMIENTO CON DICLOROACETATO DE
SODIO O PLATA COLOIDAL

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 11 de enero de 1987, hija de
Juan Antonio Chapa García y Sofía Mariel Rico Cerda.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Cirujano Dentista en 2009 con mención honorífica.

Experiencia Profesional: Maestra en la Escuela y Preparatoria Técnica Médica del
2009 al 2011, practica privada en odontología desde 2009.